

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACEUTICA



TESIS DOCTORAL

**Sistemas multiparticulares para la vectorización
de gatifloxacino en el tratamiento de la
tuberculosis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Patricia Marcianes Moreno

DIRECTORAS

Ana María Fernández-Carballido
María Sofía Elisa Negro Álvarez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**SISTEMAS MULTIPARTICULARES PARA LA
VECTORIZACIÓN DE GATIFLOXACINO EN
EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADO POR

PATRICIA MARCIANES MORENO

Bajo la dirección de las doctoras:

Ana M^a Fernández-Carballido

M^a Sofía Elisa Negro Álvarez

Madrid, 2016



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA

Memoria presentada por Patricia Marcianes Moreno para optar al Grado
de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid

Fdo.: Patricia Marcianes Moreno

VºBº

Los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: Ana Mª Fernández Carballido
Prof. Contratado Doctor del Dpto. de
Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Facultad de Farmacia U.C.M.

Fdo.: Mª Sofía Elisa Negro Álvarez
Prof. Titular del Dpto. de Farmacia
y Tecnología Farmacéutica
Facultad de Farmacia U.C.M.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que de forma directa o indirecta han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las directoras de esta memoria, las Dras. Ana M^a Fernández-Carballido y M^a Sofía Elisa Negro Álvarez, por la oportunidad de poder trabajar en su grupo de investigación. Gracias por ofrecerme generosamente vuestros conocimientos y tiempo así como el apoyo tanto profesional como personal.

Hago extensivos estos agradecimientos a los profesores del Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, en especial a las Dras. Emilia García Barcia y a Ana Isabel Torres Suárez.

Quiero además agradecer la colaboración y ayuda de la Dra. M^a Consuelo Montejo Rubio de la Universidad San Pablo-CEU.

Gracias a todos los doctorandos del Dpto., en especial a María y Ana por vuestra amistad y apoyo. También a mis compañeros de laboratorio por su ayuda y entusiasmo que me han facilitado el trabajo.

A mis amigos, en especial a Teresa por sus consejos y por hacerme ver el lado bueno de las cosas.

Por último expresar mi agradecimiento a mi familia, especialmente a mi hermana por su alegría y a mis padres por su apoyo y por ser un ejemplo de constancia y trabajo.

ABREVIATURAS

ApO	Apolipoproteína
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BHE	Barrera hematoenceálica
CD4	Tipo de Linfocitos T
CIM	Concentración mínima inhibitoria
CR	Receptor del complemento
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA/ADN	Ácido desoxirribonucleico
EE	Eficacia de encapsulación
EMA	Agencia Europea del Medicamento (<i>European Medicines Agency</i>)
FC	Receptor de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (<i>Food drug administration</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FQS	Fluoroquinolonas
GAT	Gatifloxacino
gp-P	Glicoproteína p
Gyr	Enzima girasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
LAM	Lipoarabinomanano
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDL	Receptor de lipoproteína de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
McFs	Macrófagos
MDR	Sistema de resistencia múltiple a fármacos
MDR-TB	Tuberculosis multirresistente
MMP	Metaloproteínas de matriz

MP/ MPs	Micropartículas
NO	Óxido nítrico
NP/NPs	Nanopartículas
O/A	Oleo-acuosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pa	Principio activo
PBS	Solución fosfato isotónica (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PI	Índice de polidispersión
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido Poli(láctico-co-glicólico)
PVA	Alcohol polivinílico
Rh	Rodamina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SNC	Sistema nervioso central
TB	Tuberculosis
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
UV	Ultravioleta-Visible
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
XDR	Tuberculosis extensamente resistente

ÍNDICE

ÍNDICE

I. TUBERCULOSIS	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. EPIDEMIOLOGÍA	4
3. ETIOPATOGENIA	5
3.1. Fase activa	6
3.2. Fase de latencia: equilibrio inmunológico	7
3.3. Fase de reactivación	8
4. DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS	9
5. MANIFESTACIÓN CLÍNICA	10
5.1. Tuberculosis en el sistema nervioso central (SNC)	11
5.2. Tuberculosis miliar	11
5.3. Tuberculosis pericárdica	11
5.4. Tuberculosis osteo-articular	12
5.5. Tuberculosis urinaria	12
5.6. Tuberculosis ganglionar	12
5.7. Tuberculosis laríngea	12
5.8. Tuberculosis cutánea	13
5.9. Tuberculosis intestinal	13
6. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS	13
6.1. Pacientes con enfermedad hepática crónica	15
6.2. Pacientes con insuficiencia renal crónica	16
6.3. Pacientes con tuberculosis extrapulmonar	16
6.4. Pacientes con silicosis	17
6.5. Pacientes diabéticos	17
6.6. Pacientes con dificultades para la administración de fármacos por vía oral	17
6.7. Tratamiento en pacientes con infección por el VIH	17
6.8. Tratamiento de la tuberculosis resistente	19
7. BIBLIOGRAFÍA	22

II. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	29
1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. Componentes estructurales de la barrera hematoencefálica.	31
1.2. Sistemas de transporte de la BHE.	32
2. ESTRATEGIAS PARA CONSEGUIR EL ACCESO DE FÁRMACOS AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	34
3. BIBLIOGRAFÍA	38
III. TUBERCULOSIS CEREBRAL	41
1. INTRODUCCIÓN	43
2. PATOGÉNESIS DE LA TUBERCULOSIS CEREBRAL.....	43
2.1. Mecanismo de paso de la bacteria al SNC.....	45
2.2. Respuesta inmunitaria en el sistema nervioso central.	45
2.3. Potencial neurotóxico en el cerebro.....	46
3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA TUBERCULOSIS CEREBRAL.....	47
3.1. Meningitis tuberculosa.....	47
3.2. Tuberculoma intracraneal.....	48
3.3. Aracnoiditis tuberculosa espinal.	49
4. BIBLIOGRAFÍA	50
IV. GATIFLOXACINO	55
1. INTRODUCCIÓN	57
2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.....	58
3. MECANISMO DE ACCIÓN Y ACCIONES FARMACOLÓGICAS.....	59
4. CARACTERÍSTICAS BIOFARMACÉUTICAS Y FARMACOCINÉTICAS	60
5. APLICACIONES TERAPÉUTICAS	61

6. EFECTOS ADVERSOS.....	62
7. BIBLIOGRAFÍA	63
V. OBJETIVOS	67
VI. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL GATIFLOXACINO ..	71
1. INTRODUCCIÓN	73
2. OBJETIVOS	74
3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE GATIFLOXACINO ...	74
3.1. Método de cuantificación del gatifloxacino por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	74
3.2. Método de cuantificación del gatifloxacino por espectrofotometría UV.....	79
4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA CUANTIFICACIÓN DEL GATIFLOXACINO.....	80
4.1. Resultados de la cuantificación del gatifloxacino por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	80
4.2. Resultados de la cuantificación del gatifloxacino por espectrofotometría UV en PBS.	87
4.3. Resultados de la cuantificación de gatifloxacino por espectrofotometría UV en PVA.	91
5. BIBLIOGRAFÍA	95
VII. NANOPARTÍCULAS DE GATIFLOXACINO	97
1. INTRODUCCIÓN	99
2. OBJETIVO.....	101
3. MATERIAL Y MÉTODOS	102
3.1. Elaboración de las nanopartículas de PLGA cargadas con gatifloxacino sin funcionalizar.....	102

3.2. Elaboración de nanopartículas de PLGA funcionalizadas con polisorbato 80.	103
3.3. Elaboración de nanopartículas de PLGA modificadas con labrafil.	104
3.4. Elaboración de nanopartículas de rodamina para la realización de los estudios <i>in vivo</i>	104
4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS.	105
4.1. Características morfológicas de las nanopartículas desarrolladas.....	105
<i>Difracción de rayos láser</i>	105
<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	106
4.2. Propiedades superficiales.....	107
4.3. Determinación del rendimiento del proceso y eficacia de encapsulación.....	107
4.4. Ensayo de cesión.	109
4.5. Evaluación <i>in vivo</i> del paso de nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica.....	110
<i>Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la rodamina en el cerebro</i>	112
<i>Evaluación de neurotoxicidad</i>	112
4.6. Evaluación de la biodistribución de nanopartículas de rodamina en pulmón e hígado.	113
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
5.1. Características de las nanopartículas desarrolladas.	113
<i>Tamaño y distribución de tamaños de nanopartículas de gatifloxacino</i>	114
<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	117
5.2. Propiedad superficial: determinación del potencial ζ	120
5.3. Rendimiento del proceso de elaboración y eficacia de encapsulación.....	121
5.4. Ensayo de cesión.	123

5.5. Evaluación <i>in vivo</i> del paso de nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica.....	126
<i>Caracterización de la formulación</i>	126
<i>Estudios in vivo</i>	130
<i>Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la rodamina en cerebro</i>	140
<i>Estudios de neurotoxicidad</i>	143
5.6. Evaluación de la distribución <i>in vivo</i> de nanopartículas fluorescentes en pulmón e hígado.	149
6. BIBLIOGRAFÍA	152

VIII.MICROPARTÍCULAS DE GATIFLOXACINO..... 157

1. INTRODUCCIÓN	159
2. OBJETIVO.....	162
3. MATERIALES Y MÉTODOS	163
3.1. Estudios preliminares de fagocitosis.	163
<i>Estudios de fagocitosis en animales de experimentación</i> ..	163
3.2. Elaboración de micropartículas.	164
<i>Elaboración de micropartículas inertes para la selección del tamaño de partícula</i>	165
<i>Elaboración de micropartículas de gatifloxacino</i>	166
<i>Elaboración de microesferas de fluoresceína para los estudios de fagocitosis</i>	167
4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS.....	168
4.1. Estudio de las características morfológicas de las micropartículas.....	168
<i>Difracción de rayos láser</i>	168
<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	168
4.2. Determinación del rendimiento del proceso de elaboración y eficacia de encapsulación.	169
4.3. Ensayo de cesión <i>in vitro</i>	170

5. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL PROCESO DE FAGOCITOSIS DE LAS MICROPARTÍCULAS	171
5.1. Citometría de flujo.	171
5.2. Microscopia confocal.....	172
6. RESULTADOS.....	173
6.1. Estudios preliminares de fagocitosis.	173
6.2. Caracterización de las formulaciones..	176
<i>Distribución de tamaños y rendimiento del proceso.</i>	176
<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	181
6.3. Cantidad encapsulada y eficacia de encapsulación de las formulaciones de gatifloxacino.	183
6.4. Ensayos de cesión <i>in vitro</i>	185
6.5. Evaluación <i>in vitro</i> del proceso de fagocitosis	189
<i>Caracterización de las formulaciones elaboradas con fluoresceína</i>	189
<i>Eficacia de encapsulación y cantidad encapsulada en las micropartículas de fluoresceína</i>	191
<i>Estudios in vitro</i>	191
<i>Citometría de flujo</i>	191
<i>Microscopía confocal.</i>	194
7. BIBLIOGRAFÍA	203
IX. CONCLUSIONES.....	209
X. SUMMARY	213
XI. RESUMEN.....	221

I. TUBERCULOSIS

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*.

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular identificado por primera vez por el científico alemán llamado Robert Koch. Es un bacilo aeróbico, ácido-alcohol resistente que crece en tejidos con alto contenido en oxígeno, afectando principalmente a los pulmones. Sin embargo, puede afectar a otros órganos tales como el sistema nervioso central, desarrollándose así la tuberculosis extrapulmonar (Pham y col., 2015). En la figura 1.1 se muestra la distribución por países de los casos de tuberculosis (pulmonar y extrapulmonar) declarado en el 2013 por la OMS.

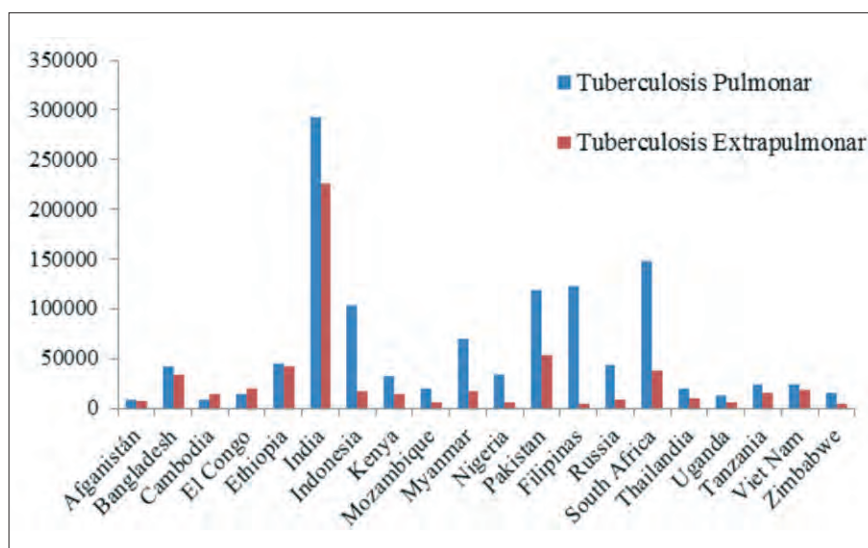


Figura 1.1. Casos de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar declarados en el 2013 por la OMS. (Adaptado de global tuberculosis report, 2014).

El bacilo de Koch, presenta una pared celular rica en lípidos en comparación con otras bacterias, posee un ciclo de replicación extremadamente lento (15-20 h), lo cual junto con su habilidad para persistir en un estado de latencia,

hacen necesario tratamientos farmacológicos de larga duración tanto para la prevención como para el tratamiento de la enfermedad.

La transmisión de esta enfermedad es de persona a persona por vía aérea, a través de la inhalación de bacilos tuberculosos suspendidos en pequeñas gotículas de tamaño comprendido entre 1-5 μm que han sido eliminados previamente por una persona infectada (*Anon, 2000; Muttill y col., 2007*). Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso, tienen a lo largo de la vida, un riesgo de enfermar de tuberculosis de un 10% (*WHO, 2015; Getahun y col., 2010*). Este riesgo es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmunitario está comprometido, como ocurre en casos de infección por el VIH (virus de inmunodeficiencia humana), malnutrición o diabetes (*Muttill y col., 2007*).

2. EPIDEMIOLOGÍA

La tuberculosis constituye un auténtico problema de salud pública. En el 2013, según la OMS, 9 millones de personas contrajeron tuberculosis y 1,5 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad. Más de la mitad de los casos (56%) pertenecen a las regiones de Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental, y una cuarta parte a la de África, que también fue la que presentó mayores tasas de incidencia y mortalidad en relación con el tamaño de la población (Figura 1.2). Solo India y China representaron el 24% y el 11% de los casos, respectivamente (*WHO, 2014*).

En los últimos años, en algunos países se está produciendo una disminución considerable de los casos de tuberculosis. Así pues, en la región oeste de Europa se ha producido un descenso de morbilidad de 25 a 5 casos por cada 100.000 habitantes.

En España, se ha producido un importante descenso en los últimos años pasando de los 40 casos a los 11,7 por cada 100.000 habitantes. Sin embargo en otros, el número de casos están descendiendo muy lentamente.

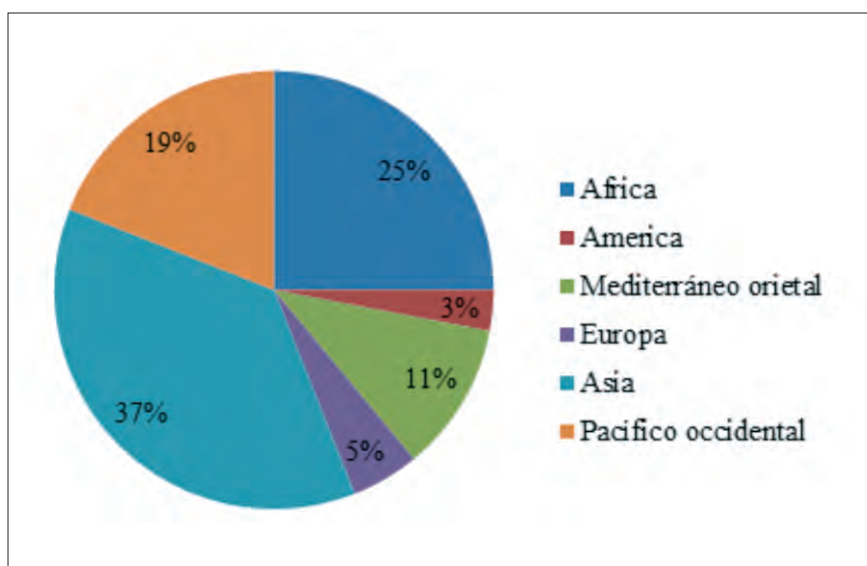


Figura 1.2. Tasa de mortalidad publicada por la OMS en el año 2013. (Adaptado de the Global Plan to Stop TB, 2011).

3. ETIOPATOGENIA

La tuberculosis pulmonar es la forma clínica más común de la enfermedad. Al ser inhaladas las micobacterias, pueden llegar hasta los alveólos pulmonares donde tiene lugar los principales mecanismos de defensa, que pueden agruparse en tres fases. Una primera fase activa o replicativa, caracterizada por la replicación inicial de *M. tuberculosis* que estimula la inmunidad mediada por células (Collins y col., 2001).

A continuación, una fase de latencia, período donde disminuye la maquinaria metabólica celular, y no se detecta la presencia del bacilo. En esta fase, el sistema inmune del hospedador mantiene el control suficiente sobre la replicación de la bacteria, de tal manera, que el individuo permanece libre de daño tisular y libre de los síntomas característicos de esta enfermedad.

Y finalmente, una fase de reactivación, estado que se establece en el 10% de los individuos inmunocompetentes. Este proceso de reactivación, tiene una

mayor incidencia en individuos inmunológicamente comprometidos (*Honer y col., 2001*).

3.1. Fase activa

Mycobacterium tuberculosis llega a los alveólos donde entra en contacto con los macrófagos alveolares, que constituyen la primea línea de defensa en el pulmón (*Collins y col., 2001*), desarrollándose así la inmunidad innata.

La respuesta inmunitaria innata se caracteriza por el reconocimiento de componentes estructurales de la pared celular de la micobacteria por parte de los receptores llamados *Toll-like* (TLR). Así, componentes como la lipoarabinomanan (LAM), lipoproteína de 19kDa y glicoproteínas al unirse al receptor tipo toll2 de los macrófagos alveolares, inducen la producción de moléculas como interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y óxido nítrico (NO), que activan señales intracelulares para la producción de proteínas involucradas en la respuesta inmune (*Reiner, 2003*).

El receptor tipo TLR9 detecta DNA micobacteriano y contribuye a la producción de citoquinas proinflamatorias (*Banaiee y col., 2006; Bafica y col., 2005*). La supresión de los genes que codifican este tipo de receptores está asociada a un aumento en la virulencia del patógeno (*Holscher y col., 2008*).

Los neutrófilos también desempeñan un papel importante no solo en la activación de los macrófagos. En este sentido, estudios recientes indican que estas células pueden secretar péptidos como LL37 con actividad frente al bacilo (*Persson y col., 2008*).

A pesar de los múltiples mecanismos de defensa característicos de la respuesta inmunitaria innata, el bacilo promueve su propia fagocitosis a través de diferentes receptores presentes en la superficie de los macrófagos tales como (*Collins y col., 2001*):

- Receptores para Fc.
- Receptores de complemento como CR1 y CR3/CR4.
- Receptores de manosa.
- Receptores scavenger.
- Receptores para la proteína surfactante A.

Después de la fagocitosis el bacilo es incluido en un fagosoma, el cual se fusiona con el lisosoma y da lugar al fagolisosoma donde es destruido por mecanismos bactericidas y proteolíticos del macrófago con la consecuente generación de péptidos y otros antígenos. Los antígenos son acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo I y presentados a los macrófagos por los linfocitos TCD8, o bien acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo II y presentados a los macrófagos por los linfocitos TCD4 (*Schluger, 2001*). La presentación antigénica constituye un paso importante en el control inmunológico de la enfermedad.

3.2. Fase de latencia: equilibrio inmunológico

M. tuberculosis tiene la capacidad de prevenir la maduración del fagosoma y entrar en un periodo de latencia con la consiguiente formación de un granuloma, tejido constituido por macrófagos y linfocitos que rodea un área central de necrosis (*Fenhalls y col., 2002*). Histológicamente se distingue un foco central caseoso, una corona de células epiteloideas y en la periferia, infiltración linfoplasmocitaria. Lo esencial en el tubérculo o granuloma son las células epiteloideas, que se disponen radialmente, como empalizada, alrededor del centro caseoso.

El granuloma se caracteriza por poseer un ambiente hipóxico. La adaptación a los bajos niveles de oxígeno es un factor importante que incrementa la capacidad del bacilo para persistir en el hospedador (*Raupach y col., 2001*). En personas cuyo sistema inmunitario está comprometido, como en el caso de los

enfermos de VIH, la capacidad para formar granulomas es escasa debido a los bajos niveles de linfocitos T CD4+ (*Shafiani y col., 2010*).

Este estado de latencia, conlleva un equilibrio inmunológico caracterizado por un retraso en el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Diferentes autores aseguran que la respuesta inmune adaptativa comienza 42 días tras la exposición e infección del individuo por parte del bacilo. Actualmente, se han identificado algunos mecanismos implicados en el retraso de la respuesta inmune adaptativa, tales como una resistencia a la activación de macrófagos y secreción de interferón γ , (*Fortune y col., 2004; Kincaid y col., 2003*) supresión en la regulación de linfocitos T, (*Scott-Browne y col., 2007*) además de diferentes mutaciones del bacilo que dificultarían la acción de la respuesta inmunitaria (*Ford y col., 2011*).

3.3. Fase de reactivación

La reactivación de *Mycobacterium tuberculosis* normalmente está caracterizada por la presencia de bacilos en secreciones respiratorias. En esta etapa desempeñan un papel importante las células CD4+. Bajos niveles de CD4+ favorece la reactivación de la enfermedad así, individuos infectados con VIH, presentan mayor susceptibilidad de ser infectados por tuberculosis (*Glynn y col., 2010*).

Diferentes factores como la diabetes, tratamiento con glucocorticoides o malnutrición favorecen la reactivación de la enfermedad (*Choi y col., 2006*). A continuación, en la figura 1.3 se muestran las etapas descritas anteriormente del proceso inmunológico tras la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

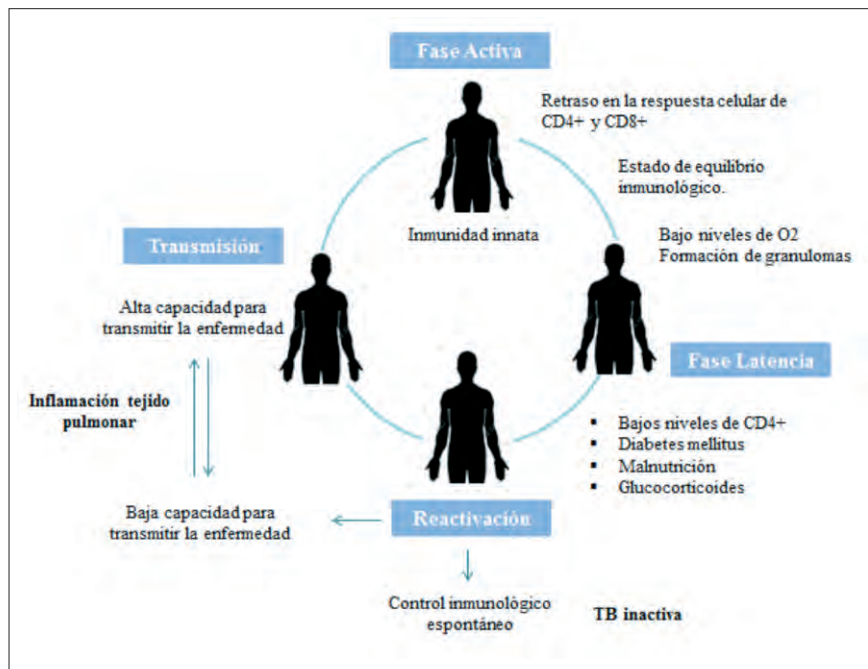


Figura 1.3. Etapas del proceso inmunológico tras la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. (Adaptado de Ernest J. D, 2012).

4. DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS

Actualmente los métodos de diagnóstico de esta enfermedad pueden dividirse en bacteriológicos, cultivo, radiológicos, prueba de la tuberculina e histológicos.

Los métodos bacteriológicos se basan en el análisis de muestras biológicas obtenidas a partir de aquellos individuos sospechosos de padecer tuberculosis. Las muestras a analizar pueden ser de origen respiratorio o no respiratorio tales como líquido cefalorraquídeo (LCR) en el caso de tuberculosis cerebral. Las muestras son sometidas a la tinción de Ziehl Neelsen, donde se pone de manifiesto la característica ácido-cohol resistente del bacilo, o bien ser analizadas por microscopía de fluorescencia con fluorocromo auramina-rodamina B donde se aprecian los bacilos como puntos brillantes sobre fondo negro.

El cultivo presenta mayor sensibilidad que la baciloscopía. Es una técnica que permite poner en evidencia bacilos viables presentes en escasa cantidad a través de pruebas bioquímicas o moleculares.

El examen radiológico normalmente consiste en una radiografía de tórax; esta prueba tiene un alto valor predictivo negativo especialmente en pacientes inmunocompetentes, la frecuencia de falsos negativos es de 1%. Este porcentaje se incrementa a un 7-15% en pacientes HIV positivos (*WHO, 2015; Getahun y col., 2010*). Radiológicamente la tuberculosis puede producir: infiltrados, nódulos, cavidades, fibrosis y retracciones.

La prueba de la tuberculínica o de Mantoux permite poner de manifiesto la existencia de una infección. Una reacción positiva a la tuberculina no indica enfermedad sino haber estado en contacto en algún momento de la vida con una micobacteria y estar sensibilizado a sus antígenos. Se considera positiva una induración superior o igual a 10 mm. En personas infectadas con el VIH se considera positiva si la induración no es inferior a 5 mm.

Por último, los estudios anatomopatológicos pueden ser realizados en cualquier tejido del organismo sospechoso de estar infectado por el bacilo.

5. MANIFESTACIÓN CLÍNICA

La tuberculosis extrapulmonar se define como aquella infección producida por *Mycobacterium tuberculosis* que afecta a tejidos y órganos fuera del parénquima pulmonar (*WHO, 2009*). Representan el 15-20% de los casos de enfermedad tuberculosa (*Kulchavenya, 2014*), aunque esta frecuencia aumenta considerablemente, hasta en un 60% de los casos, en las personas inmunodeficientes como los enfermos de VIH.

En general se trata de una reactivación de una forma latente de la infección (*Mack y col., 2009*). En la TB extrapulmonar existe un foco primario en el pul-

món. Desde este foco primario pulmonar se puede producir una diseminación, bien por contigüidad, bien por vía linfática o por vía hematógena, siendo esta última vía la causante de la mayoría de las TB extrapulmonares a excepción de la TB pleural y la TB linfática.

5.1. Tuberculosis en el sistema nervioso central (SNC)

La tuberculosis del SNC se produce por diseminación hematógena desde un foco distal o bien durante el trascurso de una tuberculosis diseminada (*Chin y col., 2013*). Presenta una morbi-mortalidad elevada, puede causar daño neurológico irreversible, parálisis cerebral, retraso mental o epilepsia (*Thwaites y col., 2009*).

Se distinguen tres formas clínicas: meningitis tuberculosa, tuberculoma intracraneal, aracnoiditis tuberculosa espinal.

5.2. Tuberculosis miliar

Se produce por una diseminación hematógena a múltiples órganos y puede ser resultado de una primoinfección o bien por reactivación de algún foco latente. Es una forma de presentación grave, que afecta fundamentalmente a personas inmunodeprimidas. Los órganos afectados con mayor frecuencia son hígado, bazo, ganglios linfáticos, meninges, médula ósea y glándulas suprarrenales (*Sharma y col., 2012*).

5.3. Tuberculosis pericárdica

Constituye una de las manifestaciones extrapulmonares poco frecuentes. Se produce bien por diseminación hematógena a partir de una primoinfección o bien por contigüidad (*Mayosi y col., 2005*). La afectación pericárdica puede limitarse a una alteración serofibrinosa, evolucionar a un cuadro de

pericarditis constrictiva o bien llegar a producir un taponamiento cardíaco (*Reuter y col., 2006*).

5.4. Tuberculosis osteo-articular

La afectación tuberculosa de la columna vertebral es la afectación ósea más frecuente y es potencialmente grave (*Peto y col., 2009*). La enfermedad puede causar dolor y destruir el tejido óseo causando aplastamiento vertebral. A su vez, la destrucción ósea causa desviaciones en la columna, compresión de las raíces nerviosas, déficits neurológicos (*Colmenero y col., 2013*).

5.5. Tuberculosis urinaria

En los países occidentales solo un 10% de los pacientes con tuberculosis pulmonar desarrollan una tuberculosis renal. Es más frecuente en adultos jóvenes y varones. Comienza con la diseminación hemática de un foco primario localizado en el pulmón, se forman granulomas en diferentes órganos siendo el riñón, el epidídimo y la próstata los órganos más afectados (*Figueiredo y col., 2008*).

5.6. Tuberculosis ganglionar

Se desarrolla tras diseminación por vía hemática o linfática. La localización más frecuente es en los ganglios linfáticos cervicales y de la región supraclavicular. La tumoración cervical es la forma de presentación más frecuente (*Cagatay y col., 2004; Handa y col., 2012*).

5.7. Tuberculosis laríngea

Actualmente es muy poco frecuente, afecta al 1% de los pacientes con tuberculosis. Se produce por diseminación a partir de un foco localizado en

el árbol bronquial. Suele cursar con presencia de masas, úlceras o nódulos a nivel de laringe y cuerdas vocales (*Kitahara y col., 2012*).

5.8. Tuberculosis cutánea

Generalmente es una manifestación de enfermedad sistémica, aunque puede adquirirse por inoculación directa o por diseminación de un foco contiguo (*Frankel y col., 2009*). Las manifestaciones de la TB cutánea dependen de la situación inmunitaria del paciente, siendo el *lupus vulgaris* la manifestación clínica predominante en pacientes inmunodeprimidos (*Barbagallo y col., 2002; Santos y col., 2014*).

5.9. Tuberculosis intestinal

Puede comprometer cualquier parte del tracto digestivo, siendo la localización más frecuente la ileocecal (*Uma y col., 2014*). La micobacteria penetra en el tejido mucoso y submucoso e inicia una reacción inflamatoria con la formación de granulomas, necrosis caseosa llevando a la formación de úlceras en la mucosa, cicatrices, fibrosis y lesiones pseudotumorales (*Chaudhary, 2014*).

6. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

Las micobacterias presentan una resistencia natural a numerosos antibacterianos, por el hecho de poseer una pared compleja, muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos; por esto, el tratamiento de la tuberculosis se realiza con antimicrobianos específicos (con actividad antituberculosa).

El esquema terapéutico estándar recomendado por la OMS, correspondiente al tratamiento de primera línea, comprende la administración diaria de cuatro antibióticos (isoniazida, pirazinamida, rifampicina y etambutol) durante

2 meses seguido de la administración de dos antibióticos (isoniazida y rifampicina) hasta los 6 meses de tratamiento.

En los casos de tuberculosis extrapulmonar severa (tuberculosis del sistema nervioso central, ósea o diseminada) la segunda fase se puede prolongar hasta completar 9 meses.

Entre los fármacos que se usan en los tratamiento de segunda línea se encuentran: estreptomicina, etionamida, kanamicina, ampicina y las fluoroquinolonas.

En la tabla 1.1 se muestra los distintos tratamientos, así como el mecanismo de acción de los mismos (*WHO, 2013*).

Tratamiento de primera línea	Mecanismo de acción
Isoniacida	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos
Pirazinamida	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos
Rifampicina	Inhibición de la transcripción, actúa sobre la enzima RNA-polimerasa
Etambutol	Inhibición de la síntesis de arabinogalactano y lipoarabinogalactano
Tratamiento de segunda línea	Mecanismo de acción
Estreptomicina	Inhibición de la síntesis proteica
Etionamida	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos
Kanamida/amicaina	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Fluoroquinolonas	Inhibición de la subunidad A de la enzima ADN-girasa

Tabla 1.1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis.

En casos de tuberculosis no muy avanzados es posible la administración de tres fármacos antituberculosos durante la fase inicial del tratamiento, siendo estos la rifampicina, isoniacida y la pirazinamida.

En niños y en embarazadas el tratamiento farmacológico utilizado es el estándar, ajustando la dosis al peso del paciente.

El tratamiento con corticoides está indicado durante las primeras semanas de tratamiento de la tuberculosis cerebral con manifestación meníngea y en la tuberculosis pericárdica debido a su acción antiinflamatoria. La dosis aconsejada es de 0,5-1 mg/kg/día de metilprednisona durante 1 mes con la disminución progresiva de la dosis hasta su retirada a los 2 meses de tratamiento. En pediatría el uso de corticoides está indicado en pacientes con masas ganglionares, enfisema o enfermedad parenquimatosa grave. Por el contrario, el uso de corticoides en las formas miliares es controvertido, únicamente está aconsejado en cuadros severos de insuficiencia respiratoria.

Debido a los efectos adversos de neuropatía periférica que puede ocasionar la isoniacida es recomendable la administración profiláctica de piridoxina en pacientes con situaciones especiales como en pacientes alcohólicos, pacientes desnutridos, embarazadas, pacientes diabéticos, o enfermos de VIH.

6.1. Pacientes con enfermedad hepática crónica

La primera opción es la instauración del tratamiento antituberculoso estándar, realizando un control de los parámetros hepáticos y funcionalidad del hígado. Si se produce alteración de la funcionalidad hepática (valores de transaminasas 5 veces por encima de su valor normal y/o fosfatasa alcalina por encima de 3 veces su valor) se suspenderá el tratamiento durante una semana substituyéndolo por fármacos no hepatotóxicos y reiniciándolo posteriormente.

En caso de enfermedad hepática avanzada se recurre a la retirada de uno de los tres fármacos con potencia hepatotóxico como isoniacida, rifampicina

o pirazinamida siendo este último fármaco la primera opción de retirada, y procurando mantener la rifampicina.

Solo en hepatitis aguda o fase terminal de enfermedad hepática crónica se procederá a la retirada completa de los fármacos hepatotóxicos y se optará por un tratamiento con quinolonas, aminoglucósidos, etambutol o clicloserina. En estos casos la duración del tratamiento dependerá de la pauta posológica utilizada.

6.2. Pacientes con insuficiencia renal crónica

La isoniacida, la rifampicina y la pirazinamida se eliminan por vía biliar o se biotransforman a nivel hepático por lo que pueden administrarse a las dosis habituales a los pacientes con insuficiencia renal. Si existe insuficiencia renal grave, junto con la isoniacida el paciente debe recibir piridoxina, para prevenir la neuritis periférica.

La estreptomycinina y el etambutol son excretados por el riñón pero se pueden administrar a dosis bajas si se dispone de medios para vigilar atentamente la función renal. La tioacetazona se elimina en parte a través de la orina; pero teniendo en cuenta la proximidad de la dosis terapéutica y la dosis tóxica, no conviene administrarla en caso de insuficiencia renal.

La pauta más segura para los pacientes con insuficiencia renal es la siguiente: tratamiento durante 2 meses con isoniazida, rifampizina y pirazinamida seguido de un tratamiento de 6 meses que incluye isoniazida y rifampicina.

6.3. Pacientes con tuberculosis extrapulmonar

Las recomendaciones sobre el tratamiento de la tuberculosis extrapulmonar no son unánimes. En general, se recomienda utilizar las mismas pautas que en

la tuberculosis pulmonar y prolongar la duración del tratamiento en situaciones especiales como en la meningitis tuberculosa y en la espondilitis tuberculosa con afectación neurológica.

6.4. Pacientes con silicosis

Debido a la alteración inmunológica de los macrófagos provocada por la sílice en estos enfermos, es recomendable prolongar la duración de tratamiento estándar a 9 meses (*WHO, 2013*).

6.5. Pacientes diabéticos

Debido a la inmunosupresión que produce la diabetes, se recomienda la prolongación del esquema terapéutico estándar a 9 meses de tratamiento. Dada la inducción enzimática de la rifampicina, responsable de reducir los niveles séricos de los hipoglucemiantes es necesario realizar un seguimiento de los niveles de glucemia durante el tratamiento simultáneo.

6.6. Pacientes con dificultades para la administración de fármacos por vía oral

Además de la estreptomicina existen presentaciones parenterales de los fármacos antituberculosos de primera línea. Sin embargo, la administración por sonda nasogástrica es una de las alternativas más utilizadas en la actualidad.

6.7. Tratamiento en pacientes con infección por el VIH

La epidemia de VIH ha acrecentado la incidencia de la TB, sobre todo en las poblaciones que presentan una elevada prevalencia de TB entre los adultos jóvenes. Se estima que hay en el mundo dos mil millones de personas

infectadas por *M. tuberculosis*, 16 millones de personas infectadas por el VIH, y de cinco a seis millones de personas que presentan una doble infección, *M. tuberculosis* y VIH. En estos pacientes, la prioridad siempre es tratar la tuberculosis, particularmente la tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva dada la necesidad de detener la transmisión. El tratamiento por tanto debe ser diferido, habitualmente la terapia antirretroviral se instaure a las dos semanas del inicio del tratamiento con antituberculosos. El manejo diferido de ambos tratamientos se debe a los siguientes motivos; evitar interacciones de medicamentos, simplificar la identificación de efectos adversos, mejorar la adherencia, disminuir la incidencia y severidad del Síndrome Inflamatorio de Reconstitución Inmunológica (SIRI).

La rifampicina es un potente inductor del sistema citocromo P 450 hepático CYP3A y acelera el metabolismo de muchos fármacos antirretrovirales disminuyendo significativamente los valores plasmáticos de los mismos, provocando niveles subterapéuticos. Por ello, el tratamiento simultáneo de rifampicina con fármacos inhibidores de la proteasa no puede llevarse a cabo a excepción del ritonavir. La rifampicina también induce el metabolismo de los fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos a nucleósidos pero en menor grado, siendo el efavirenz el antirretroviral de elección para pacientes infectados por VIH (*Pedral- Sampaio y col., 2004*).

La isoniazida al igual que los inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (estavudina y didanosina) pueden causar neuropatía periférica, por lo que se incrementa el potencial de toxicidad en los tratamientos con estos fármacos.

En la actualidad se recomienda seguir el esquema terapéutico estándar para los pacientes con tratamiento antirretroviral siempre que se administre 2 análogos de nucleósidos en combinación con efavirenz, nevirapina o enfuvirtida (*WHO, 2012*). En caso de no poder utilizarse estas combinaciones puede sustituirse la rifampicina por la rifabutina cuya interacción con los inhibidores de la proteasa es menor.

6.8. Tratamiento de la tuberculosis resistente

El alto porcentaje de efectos adversos como ototoxicidad y nefrotoxicidad y la extensa duración del tratamiento ha dado lugar a una baja adherencia al tratamiento desarrollándose resistencias y dando lugar al fracaso terapéutico (*WHO, 2012; Lin y col., 2014*).

Se conoce como tuberculosis multirresistente (MDR-TB) la causada por una cepa que no responde al tratamiento con los dos fármacos antituberculosos de primera línea más eficaz: isoniacida y rifampicina (*WHO, 2006*).

La tuberculosis extensamente resistente (XDR) es por definición aquella infección resistente al menos a rifampicina e isoniacida además de alguna quinolona o al menos a un tratamiento de segunda línea (capreomicina, amikacina, kanamicina).

Una de las principales razones de la aparición de cepas resistentes de TB es la exposición de las micobacterias a niveles sub-terapéuticos de uno o más antibióticos, ya que los tratamientos actuales no son capaces de llegar al lugar de acción debido a la poca vascularización que presentan las lesiones pulmonares (*Salamon y col., 2015*).

El régimen de tratamiento en la tuberculosis resistente (MDR-TB) debe constar al menos de 3 de los 4 fármacos eficaces durante al menos 6 meses de tratamiento. Si no es posible la administración de isoniacida, la duración del tratamiento debe prolongarse durante 12 meses y esta se sustituirá por etambutol. Cuando el fármaco antituberculoso no utilizado es la rifampicina se deberá sustituir por etambutol y alargar el tratamiento durante 18 meses. En el caso de que la pirazinamida no pueda utilizarse, también se deberá sustituir por etambutol prolongando el tratamiento hasta los 9 meses. Por último, sino es posible la administración de pirazinamida e isoniacida el tratamiento deberá prolongarse de 18 a 24 meses (*WHO, 2013*).

En MDR-TB es recomendable el uso de fluoroquinolonas durante todo el tiempo del tratamiento. Las fluoroquinolonas son antibióticos de amplio espectro cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la ADN girasa de las bacterias impidiendo su replicación. Tienen concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) bajas frente a *Mycobacterium tuberculosis* y son activas frente a bacterias extracelulares e intracelulares (Perry y col., 2002). Moxifloxacino y gatifloxacino tienen actividad bactericida temprana que se muestra a partir de los 5 días de tratamiento (Jhonson J. L y col., 2006).

Un estudio prospectivo de MDR-TB ha demostrado la eficacia dosis dependiente de las fluoroquinolonas en el tratamiento de la esta enfermedad. Esta eficacia terapéutica se ha visto incrementada cuando se utiliza tanto gatifloxacino como moxifloxacino debido probablemente a la presencia del grupo metoxi en el posición 8 del ciclo aromático (Devasia y col., 2009).

En los últimos años se están realizando diversos ensayos clínicos en fase II y III a fin de poner a prueba la seguridad y eficacia de tratamientos de duración inferior al estándar (6 meses) que incluyen fluoquinolonas, tales como moxifloxacino y gatifloxacino (Merle y col., 2012; Merle y col., 2014; Rustomjee y col., 2008). Los resultados obtenidos han mostrado que no existen diferencias significativas en la eficacia y seguridad de los tratamientos de 4 meses que incluyen gatifloxacino respecto al estándar de 6 meses de duración (Ruan y col., 2016; Rustomjee y col., 2008; Conde y col., 2009; Burman y col., 2006). Además, es segura la inclusión de moxifloxacino o gatifloxacino en el tratamiento inicial de la tuberculosis (Conde y col., 2009; Burman y col., 2006).

Finalmente indicar que bedaquilina (Sirturo®) y delamanida (Deltiba®) son los dos únicos fármacos desarrollados en los últimos años para el tratamiento de la TB resistente.

La bedaquilina pertenece a las diarilquinolinas, que inhiben específicamente la adenosina 5'-trifosfato (ATP) sintasa micobacteriana, una enzima esencial para la generación de energía en *M. tuberculosis*. La inhibición de la

ATP sintasa produce efectos bactericidas para los bacilos. Este fármaco fue aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en Diciembre del 2012 para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar multirresistente en adultos como parte de un tratamiento combinado solo cuando no exista otro tratamiento efectivo disponible (*Mahajan, 2013*). La aprobación por parte de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) fue posterior, en Marzo del 2014, en España está autorizado, pero su comercialización aún no se ha producido.

La delamanida actúa inhibiendo la síntesis de los componentes de la pared celular del bacilo. Fue autorizado por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en Noviembre de 2013. Ambos fármacos han mostrado eficacia contra la TB resistente en ensayos en ensayos clínicos fase II. Actualmente se están realizando estudios clínicos en Fase III para bedaquilina (*European Medicines Agency, 2013*).

7. BIBLIOGRAFÍA

American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161: 1376-1395, 2000.

Bafica A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.*, 202: 1715-1724, 2005.

Banaiee N., Kincaid E. Z., Buchwald U., Jacobs W. R., Ernst J. D. Potent inhibition of macrophage responses to IFN- γ by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J. Immunol.*, 176: 3019-3027, 2006.

Barbagallo J., Tager P., Ingleton R., Hirsch R. J., Weinberg J. M. Cutaneous tuberculosis: diagnosis and treatment. *Am. J. Clin Dermatol.*, 3: 319-328, 2002.

Burman W. J., Goldberg S., Johnson J. L., Muzanye G., Engle M., Mosher A. W., Choudhri S., Daley C. L., Munsiff S. S., Zhao Z., Vernon A., Chaisson R. E. Moxifloxacin versus ethambutol in the first 2 months of treatment for pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 174: 331-338, 2006.

Cagatay A. A., Caliskan Y., Aksoz S., Gulec L., Kucukoglu S., Cagatay Y. Extrapulmonary tuberculosis in immunocompetent adults. *Scand. J. Infect.*, 36: 799-806, 2004.

Chaudhary P. Hepatobiliary tuberculosis. *Ann. Gastroenterol.*, 27: 207-11, 2014.

Chin J. H., Mateen F. J. Central nervous system tuberculosis: Challenges and advances in diagnosis and treatment. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 15: 631-635, 2013.

Choi H. K. Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis. *Arthritis Rheum.*, 55: 19-26, 2006.

Collins H. L., Kaufmann S. H. The many faces of host responses to tuberculosis. *Immun.*, 103: 1-9, 2001.

Colmenero J. D., Ruiz-Mesa J. D., Sanjuan-Jimenez R., Sobrino B., Morata P. Establishing the diagnosis of tuberculous vertebral osteomyelitis. *Eur. Spine J.*, 22: 579-583, 2013.

Conde M. B., Efron A., Loredó C., De Souza G. R., Graça N. P., Cezar M. C., Ram M., Chaudhary M. A., Bishai W. R., Kritski A. L., Chaisson R. E. Moxifloxacin versus ethambutol in the initial treatment of tuberculosis: a double-blind, randomised, controlled phase II trial. *Lancet*, 73: 1183-1189, 2009.

Devasia R. A., Blackman A., May C., Eden S., Smith T., Hooper N., Maruri F., Stratton C., Shintani A., Sterling T. R. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: an assessment of MGIT 960, MODS and nitrate reductase assay and fluoroquinolone cross-resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63: 1173-1178, 2009.

Ernest J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature*, 12: 581-593, 2012.

European Medicines Agency. Sirturo bedaquiline, 2013.

Fenhalls G., Stevens L., Moses L., Bezuidenhout J., Betts J. C., Van-Helden P. In situ detection of *Mycobacterium tuberculosis* transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. *Infect. Immun.*, 70: 6330-6338, 2002.

Figueiredo A. A., Lucon A. M. Urogenital tuberculosis: update and review of 8961 cases from the world literature. *Rev. Urol.*, 3: 207-217, 2008.

Ford C. B. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nature Genet.*, 43: 482-486, 2011.

Fortune S. M. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN- γ through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol.*, 172: 6272-6280, 2004.

Frankel A., Penrose C., Emer J. Cutaneous tuberculosis: a practical case report and review for the dermatologist. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, 10: 19-27, 2009.

Getahun H., Gunneberg C., Granich R., Nunn P. HIV infection-associated tuberculosis: the epidemiology and the response. *Clin. Infect. Dis.*, 50: 201-207, 2010.

Glynn J. R. High rates of recurrence in HIV infected and HIV-uninfected patients with tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 201: 704-711, 2010.

Handa U., Mundi I., Mohan S. Nodal tuberculosis revisited: a review. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 1: 6-12, 2012.

Holscher C. Containment of aerogenic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice does not require MyD88 adaptor function for TLR2, -4 and -9. *Eur. J. Immunol.*, 38: 680-694, 2008.

Honer B. K., Russell D. G. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol.*, 9: 597-605, 2001.

Johnson J. L., Hadad D. J., Boom W. H., Daley C. L., Peloquin C. A., Eisenach K. D., Jankus D. D., Debanne S. M., Charlebois E. D., Maciel E., Palaci M., Dietze R. Early and extended early bactericidal activity of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 10: 605-612, 2006.

Kincaid E. Z., Ernst J. D. *Mycobacterium tuberculosis* exerts gene-selective inhibition of transcriptional responses to IFN- γ without inhibiting STAT1 function. *J. Immunol.*, 171: 2042-2049, 2003.

Kitahara K., Yano Y., Mori M., Yokota S. Laryngeal tuberculosis: a diagnosis that should be remembered. *Intern. Med.*, 51: 2841-2842, 2012.

Kulchavenya E. Extrapulmonary tuberculosis: are statistical reports accurate?. *Ther. Adv. Infect. Dis.*, 2: 61-70, 2014.

Lin S. Y., Desmond E. P. Molecular diagnosis of tuberculosis and drug resistance. *Clin. Lab. Med.*, 34: 297-314, 2014.

Mack U., Migliori G. B., Sester M., Rieder H. L., Ehlers S., Goletti D. Latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*?. *Eur. Respir. J.*, 33: 956-973, 2009.

Mahajan R. Bedaquiline: first FDA-Approved tuberculosis drug in 40 years. *In. J. Appl. Basic Med. Res.*, 3: 1-2, 2013.

Mayosi B. M., Burgess L. J., Doubell A. F. Tuberculous pericarditis. *Circulation*, 112: 3608-3616, 2005.

Merle C. S., Sismanidis C., Sow O. B., Gninafon M., Horton J., Lapujade O., Lo M. B., Mitchinson D. A., Perronne C., Portaels F., Odhiambo J., Olliaro P., Rustomjee R., Lienhardt C., Fielding K. A pivotal registration phase III, multicenter, randomized tuberculosis controlled trial: desing issues and lesson learnt from the Gatifloxacin for TB (OFLOTUB) project *Trials*, 18:13-61, 2012.

Merle C. S., Fielding K., Sow O. B., Gninafon M., Lo M. B., Mthiyane T., Odhiambo J., Amukoye E., Bah B., Kassa F., N'Diaye A., Rustomjee R., Jong B. C., Horton J., Perronne C., Sismanidis C., Lapujade O., Olliaro P. L., Lienhardt C. A four-month gatifloxacin containing regimen for treating tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, 17: 1588-1598, 2014.

Muttill P., Kaur J., Kumar K., Yadav A. B., Sharma R., Misra A. Inhalable microparticles containing large payload of anti-tuberculosis drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 32: 140-150, 2007.

Organización Mundial de la Salud. Temas de salud. Tuberculosis. Publicaciones. Disponible en: <http://www.who.int>. Fecha de último acceso noviembre 2015.

Pedral-Sampaio D. B., Alves C. R., Netto E. M., Brites C., Oliveira A. S., Badaro R. Efficacy and safety of Efavirenz in HIV patients on Rifampin tuberculosis. *Braz. J. Infect. Dis.*, 8: 211-216, 2004.

Persson Y. A., Blomgran-Julinder R., Rahman S., Zheng L., Stendahl O. *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils trigger a pro-inflammatory response in macrophages through release of heat shock protein 72, acting in synergy with the bacteria. *Micro. Infect.*, 10: 233-240, 2008.

Perry C. M., Ormrod D., Hurst M. Gatifloxacin: a review of its use in the management of bacterial infections. *Drugs*, 62: 169-207, 2002

Peto H. M., Pratt R. H., Harrington T. A., Armstrong L. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clin. Infect. Dis.*, 49: 1350-1357, 2009.

Pham D. D., Fattal E., Tsapis N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. *Int. J. Pharm.*, 478: 517-529, 2015.

Raupach B., Kaufman S. H. E. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.*, 13: 417-428, 2001.

Reiner N. E. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through toll-like receptor-2. *J. Immun.*, 170: 2409-2416, 2003.

Reuter H., Burgess L., Van Vuuren W., Doubell A. Diagnosing tuberculous pericarditis. *Q. J. M.*, 12: 827-839, 2006.

Ruan Q., Liu Q., Sun F., Shao L., Jin J., Yu S., Ai J., Zhang B., Zhang W. Moxifloxacin and gatifloxacin for initial therapy of tuberculosis: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Emerg. Microbes Infect.*, 24: 1038-1050, 2016.

Rustomjee R., Lienhardt C., Kanyok T., Davies G. R., Levin J., Mthiyane T., Reddy C., Sturm A. W., Sirgel F. A., Allen J., Coleman D. J., Fourie B., Mitchison D. A. A phase II study of the sterilizing activities of ofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2: 128-138, 2008.

Salamon H., Yamaguchi K. D., Cirillo D. M., Miotto P., Schito M., Posey J., Starks A. M., Niemann S., Alland D., Hanna D., Aviles E., Perkins M. D., Dolinger D. L. Integration of published information into a resistance-associated mutation database for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.*, 2: 50-57, 2015.

Santos J. B., Figueiredo A. R., Ferraz C. E., Oliveira M. H., Silva P. G., Medeiros V. L. Cutaneous tuberculosis: epidemiologic, etiopathogenic and clinical aspects. *An. Bras. Dermatol.*, 89: 219-228, 2014.

Schluger N. W. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir. Res.*, 2: 157-163, 2001.

Scott-Browne J. P. Expansion and function of Foxp3expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J. Exp. Med.*, 204: 2159-2169, 2007.

Shafiani S., Tucker-Heard G., Kariyone A., Takatsu K., Urdahl K. B. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J. Exp. Med.*, 207: 1409-1420, 2010.

Sharma S. K., Mohan A., Sharma A. Challenges in the diagnosis and treatment of miliary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.*, 135: 703-730, 2012.

Thwaites G., Fisher M., Hemingway C., Scott G., Solomon T., Innes J. British Infectious Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. *J. Infect.*, 59: 167-187, 2009.

Uma D., Vasudevan R., Kaushal K., Saroj K., Arun K. Abdominal tuberculosis of the gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol.*, 40: 14831-14840, 2014.

II. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central se encuentra protegido y aislado del resto del organismo por una serie de barreras que impiden o dificultan el paso de sustancias tóxicas al cerebro. Dentro de estas barreras se encuentran la barrera hemo-cefalorraquídea, la barrera sangre-aracnoides y la barrera hematoencefálica (BHE).

La barrera hemo-cefalorraquídea se localiza en el epitelio del plexo coroides, es la responsable de limitar el acceso de sustancias extrañas desde el torrente circulatorio al líquido cefalorraquídeo. Parece que la permeabilidad de los fármacos en esta zona es mayor que la existente en el endotelio de la barrera hematoencefálica.

La barrera cefalorraquídeo-cerebral, está formado por una capa constituida por células epiteliales ubicadas entre el líquido cefalorraquídeo y el cerebro. Su principal función es impedir el paso de macromoléculas desde la sangre.

La barrera hematoencefálica es una barrera física, metabólica e inmunológica. Se localiza en la interfaz entre el encéfalo y los vasos sanguíneos. Su principal función es proteger al SNC de sustancias tóxicas y mantener la homeostasis de las neuronas (*Misra y col., 2003; Begley y col., 2003*).

1.1. Componentes estructurales de la barrera hematoencefálica

La BHE estructuralmente está constituida por capilares sanguíneos rodeados de células endoteliales especializadas aunque otras células, como los pericitos, astrocitos y células neuronales, también desempeñan un papel importante en la diferenciación y el mantenimiento estructural y funcional de la barrera hematoencefálica (*Abbott y col., 2010*).

Las células endoteliales, son un elemento clave que determina las propiedades de la BHE con una serie de características morfológicas y funcionales que

las diferencian del resto de las células. Estas células, presentan unas uniones estrechas y sin poros lo que incrementa la resistencia eléctrica intercelular. Están constituidas por dos membranas plasmáticas en serie que forman un endotelio continuo, con una carga superficial negativa debido a la presencia de mucopolisacáridos, glucolípidos y glucoproteínas. Además contienen diferentes receptores y transportadores que son específicos para el paso de algunas molécula al SNC (*De Boer y Gaillard, 2007; Koziara y col., 2006*).

Los capilares cerebrales se hallan envueltos por las prolongaciones citoplasmáticas aplanadas de un tipo de células gliales del SNC, los astrocitos. Estas células presentan cuerpos celulares pequeños con prolongaciones que se ramifican. Existen dos tipos de astrocitos, los fibrosos que se localizan en la sustancia blanca, y los protoplasmáticos localizados en la sustancia gris. Ambos proporcionan un marco de sostén, son aislantes eléctricos, limitan la diseminación de los neurotransmisores, captan iones de K^+ , almacenan glucógeno y tienen función fagocítica (*Abbott y col., 2006; De Boer y Gaillard, 2006*).

Los pericitos son células localizadas en la lámina basal de las células endoteliales, son células fagocíticas con propiedades contráctiles que desempeñan un papel importante para el correcto funcionamiento de la BHE (*Sá-Pereira y col., 2012*).

1.2. Sistemas de transporte de la BHE

Existen diferentes mecanismos de transporte implicados en el paso de compuestos al SNC a través de la BHE. Dentro de estos mecanismos se encuentran el transporte pasivo y el transporte activo que a su vez engloba el transporte activo de salida, el transporte mediado por portadores, el transporte mediado por receptores, y el transporte mediado por adsorción (*Chen y col., 2004; Koziara y col., 2006*).

El transporte pasivo a través de la BHE está condicionado por dos factores, el peso molecular y la lipofilia de la sustancia, siendo necesario ambas caracte-

rísticas para que una molécula atraviese la barrera. Diferentes estudios afirman que el peso molecular debe ser inferior a 600 Da para poder difundir de forma pasiva a través de la BHE (*Koziara y col., 2006*). La lipofilia sin embargo, es un factor que podría reducir el tiempo de permanencia en el torrente sanguíneo, ya que estas sustancias son rápidamente identificadas como partículas extrañas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM) siendo eliminadas del torrente sanguíneo antes incluso de que lleguen al sitio de actuación (*Pardridge, 2001*).

Por otro lado, muchas sustancias con lipofilia y peso molecular adecuados que consiguen acceder al SNC, no alcanzan concentraciones adecuadas en el cerebro, debido a la presencia de sistemas de eflujo tales como la glicoproteína-P (gp-P) que expulsa a ciertas sustancias al torrente circulatorio (*Gottesman y col., 1995*).

La gp-P constituye un sistema de transporte activo de salida que se expresa en varios tejidos tales como: canales biliares, conductos pancreáticos, intestino delgado y grueso, túbulos proximales del riñón, glándula adrenal, placenta y en las células endoteliales del sistema nervioso central. Esta glicoproteína pertenece a la superfamilia de transportadores de membrana. Está compuesta por una cadena de aproximadamente 1280 residuos de aminoácidos con dos mitades homólogas y 12 dominios transmembrana. Presenta dos zonas de unión al ATP ubicadas en la parte citoplasmática, un sitio de glicosilación entre el primero y el segundo dominio transmembrana y varios sitios de fosforilación (*German y col., 1996*). El mecanismo de eflujo no está del todo claro, algunos autores afirman que las sustancias pasan a través de un poro hidrofóbico formado por un dominio transmembrana y que la salida de las sustancias requiere de un cambio conformacional de la proteína dependiente de energía. Se ha sugerido que el estado de fosforilación de la gp-P puede regular este proceso (*Shapiro y Ling, 1995*). Una segunda hipótesis afirma que se debe a un cambio de gradiente de pH y/o eléctrico en las membranas plasmáticas (*Roepe y col., 1993*).

El transporte mediado por receptores es un proceso que implica la endocitosis y/o transcitosis del complejo ligando-receptor. Este tipo de transporte

es dependiente de energía y temperatura, y es saturable. Se han identificado diferentes receptores como el receptor de insulina, de transferrina, de un factor de crecimiento similar a la insulina y de leptina. Estos receptores de péptidos pueden mediar funcionalmente diferentes procesos, incluyendo la transcitosis de ligandos desde sangre al cerebro o revertir la transcitosis de cerebro a sangre (*Scherrmann, 2002*). Algunos receptores, como el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), consiguen el paso de sustancias por un proceso mediado por endocitosis a través de las células endoteliales, siendo este paso más lento que el transporte a través de los receptores de transferrina.

El transporte mediado por adsorción se ha estudiado como estrategia para la administración de péptidos y proteínas en el SNC. Se produce como resultado de una interacción electrostática entre las cargas negativas de la membrana plasmática de los capilares de cerebro y la región del péptido cargada positivamente. Este tipo de transporte es saturable y no específico (*Koziara y col., 2006*).

El transporte mediado por portadores es el responsable de transportar nutrientes o moléculas relativamente pequeñas al interior del SNC. Estos portadores son saturables y puede modificarse debido a la presencia de inhibidores competitivos y no competitivos (*De Boer y col., 2007*). Los primeros que se descubrieron son los transportadores de glucosa, que pueden transportar también otras hexosas. Así mismo, se han identificado al menos ocho sistemas diferentes de transporte que son selectivos para diferentes sustratos: transportadores de aminoácidos, de nucleótidos, de bases púricas y de ácidos monocarboxílicos.

2. ESTRATEGIAS PARA CONSEGUIR EL ACCESO DE FÁRMACOS AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La mayoría de los fármacos no consiguen atravesar la BHE, esto supone un importante obstáculo para el tratamiento de enfermedades que afectan al SNC. En este sentido, el principal objetivo para el tratamiento de estas enfer-

medades, es el desarrollo de estrategias eficaces que permitan el paso de fármacos al cerebro.

Una de las estrategias utilizada se basa en aprovechar el aumento de la permeabilidad de la BHE que se produce en algunas patologías, junto con la utilización de diferentes moléculas como la bradicinina, la serotonina o la histamina que potencian el aumento de la permeabilidad de la barrera. Sin embargo, esta estrategia está asociada a una sobreexpresión de moléculas potencialmente tóxicas que hacen al cerebro más susceptible a las infecciones, siendo una estrategia no apta para enfermedades infecciosas (*Joshi y col., 2007*).

Otra alternativa es la introducción de fármacos directamente en el parénquima cerebral a través de una administración intracraneal. La limitación de este procedimiento es lograr que el principio activo difunda para alcanzar el lugar de acción. La difusión del activo en el cerebro depende del peso molecular, de la liposolubilidad, de la polaridad y de la afinidad que tenga por los tejidos diana. En muchos casos, la velocidad de difusión tras la inyección suele ser menor que la velocidad de eliminación obteniendo concentraciones subterapéuticas en el lugar de acción (*Groothuis y col., 2000*). Esta estrategia no resulta adecuada para el gatifloxacino, principio activo objeto de la presente memoria experimental, ya que su lipofilia condiciona su acceso en concentraciones adecuadas en el parénquima cerebral, ocasionando una ineficacia terapéutica en el tratamiento de la tuberculosis cerebral.

Las técnicas no invasivas son en la actualidad, la estrategia más prometedoras para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. En este sentido, uno de los retos más importantes de la tecnología farmacéutica, es desarrollar sistemas de transporte eficaces que permitan el paso a través de la BHE para el tratamiento de enfermedades del SNC como es el caso de la tuberculosis cerebral. La nanotecnología supone una herramienta eficaz para alcanzar este objetivo ya que permite la vectorización de fármacos empleando nanopartículas (NPs).

Una de las limitaciones de las nanopartículas es que pueden ser identificadas como partículas extrañas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM) y eliminadas rápidamente del torrente circulatorio hacia el hígado y el bazo. En el caso de las nanopartículas (NPs) poliméricas elaboradas con poliésteres biodegradables, como el PLA (poliláctico) o el PLGA, se han empleado diferentes estrategias para reducir la captación por el SFM. Así, se han modificado la superficie de las NPs empleando polímeros hidrófilos, tensioactivos o incorporando copolímeros biodegradables que aumenten la hidrofilia de estos sistemas. Estos cambios en la superficie consiguen aumentar su vida media en el torrente sanguíneo favoreciendo su llegada al lugar de acción (*Vilella y col., 2015*). El mecanismo por el cual se aumenta la permanencia de estos sistemas en el torrente circulatorio no está del todo claro, probablemente el recubrimiento con dichos agentes aumentan las interacciones repulsivas entre los compuestos sanguíneos y los nanovehículos, bloqueando y retrasando el proceso de opsonización.

Por otra parte, estudios realizados por distintos investigadores indican que las NPs de PLGA con tamaños alrededor de 250 nm pueden atravesar la BHE (*Hillaireau H. y col., 2009; Suchlfart S. y col., 2012*). Sin embargo, el porcentaje de nanopartículas capaz de atravesar la barrera es bajo. En este sentido, se han estudiado diferentes estrategias para mejorar el paso de las nanopartículas al SNC. Por ello, se han utilizado distintas estrategias tales como recubrir la nanopartículas con agentes tensioactivos o modificar su superficie con ligandos específicos. El desarrollo de nanopartículas poliméricas recubiertas con polisorbato 80 consigue aumentar el paso de las mismas a través de la barrera hematoencefálica (*Kreuter, 2014*). Además, el recubrimiento de estos sistemas con agentes tensoactivos como poloxamer o poloxaminas al interaccionar con varias moléculas efectoras y activar la expresión de genes, consiguen inhibir el desarrollo del sistema de resistencia múltiple a fármacos (MDR), que se desarrolla rápidamente en muchas enfermedades cerebrales permitiendo mejorar el acceso de los fármacos al SNC (*Zhan W. y Fang X. L., 2008; Kreuter 2014*).

Tal como se ha indicado previamente, dentro de las estrategias empleadas para favorecer el paso a través de BHE se encuentra la funcionalización de NPs con anticuerpos o ligandos específicos de receptores que se encuentran sobreexpresados en la superficie de la barrera. En este sentido, se han realizado estudios empleando como ligandos diferentes proteínas como la transferrina, péptidos, anticuerpos o toxinas (*Vilella y col., 2015; Tosi y col., 2010*).

3. BIBLIOGRAFÍA

Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., Yusof S. R., Begley D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.*, 37: 13-25, 2010.

Abbott N. J., Ronnback L., Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7: 41-53, 2006.

Begley D. J., Brightman M. W. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog. Drug Res.*, 61: 39-78, 2003.

Chen Y., Dalwadi G., Benson H. A. Drug delivery across the blood-brain barrier. *Curr. Drug Deliv.*, 1: 361-376, 2004.

De Boer A. G., Gaillard P. J. Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *J. Neural Transm.*, 113: 455-462, 2006.

De Boer A. G., Gaillard P. J. Drug targeting to the brain. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47: 323-355, 2007.

German U. A. P-glycoprotein: a mediator of multidrug resistance in tumour cell. *Eur. J. Cancer*, 32: 927-944, 1996.

Gottesman M. M., Hrycyna C. A., Schoenlein P. V., Germann U. A., Pastan I. Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Genet.*, 29: 607-649, 1995.

Groothuis D. R. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro. Oncol.*, 2: 45-59, 2000.

Hillaireau H., Couvreur P. Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery cell. *Mol. Life Sci.*, 60: 2873-2896, 2009.

Joshi S., Ornstein E., Bruce J. N. Targeting the brain. Rationalizing the novel methods of drug delivery to the central nervous system. *Neurocrit. Care*, 6: 200-212, 2007.

Koziara J. M., Lockman P. R., Allen D. D., Mumper R. J. The blood-brain barrier and brain drug delivery. *J. Nanosci. Nanotech.*, 6: 2712-2735, 2006.

Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 71: 2-14, 2014.

Misra A., Ganesh S., Shahiwala A., Shah S. P. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J. Pharm Pharm. Sci.*, 6: 252-273, 2003.

Pardridge W. M. Brain drug targeting: the future of brain drug development. Cambridge: Cambridge University Press, 36-81, 2001.

Roepe P. D., Wei L. Y., Curz J., Carlson D. Lower electrical membrane potential and altered pH homeostasis in multidrug resistant (mdr) cells-further characterization of a series of mdr cell lines expressing different levels of p-glycoprotein. *Biochem.*, 32: 11042-11056, 1993.

Sá-Pereira I., Brites D., Brito M. A. Neurovascular Unit: a Focus on Pericytes. *Mol. Neurobiol.*, 45: 327-347, 2012.

Scherrmann J. M. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul. Pharm.*, 38: 349-354, 2002.

Shapiro A. B., Ling V. Reconstitution of drug transport by purified p-glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 270: 16167-1675, 1995.

Suchlfart S., Gelperina S., Kreuter J. Transport of drug across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release*, 161: 264-273, 2012.

Tosi G., Vergoni A. V., Ruozzi B., Bondioli L., Badiali L., Rivasi F., Costantino L., Forni F., Vandelli M. A. Sialic acid and glycopeptides conjugated PLGA nanoparticles for central nervous system targeting: In vivo pharmacological evidence and biodistribution. *J. Control. Release*, 145: 49-57, 2010.

Vilella A., Ruozzi B., Belletti D., Pederzoli F., Galliani M., Semeghini V., Forni F., Zoli M., Vandelli M. A., Tosi G. Endocytosis of Nanomedicines: The Case of Glycopeptide Engineered PLGA Nanoparticles. *Pharm.*, 7: 74-89, 2015.

Zhang W., Fang X. L. Significant role of poloxamer in drug transport across blood-brain barrier. *Acta Pharm. Sinica*. 43: 890-897, 2008.

III. TUBERCULOSIS CEREBRAL

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis cerebral, representa una de las formas de tuberculosis extrapulmonar más severa con altos porcentajes de morbilidad y mortalidad que afecta predominantemente a personas jóvenes (*Jacobs y col., 2003*). Se han identificado muchos factores de riesgos asociados a esta enfermedad, siendo los jóvenes y personas infectadas por el virus de VIH, los que presentan más probabilidad de desarrollarla (*Rock y col., 2008; Rana y col., 2000*). Otros factores como el alcoholismo, malnutrición, y comorbilidades del paciente como la presencia de insuficiencia renal crónica, diabetes mellitus o la existencia de inmunosupresión, juegan también un papel importante en el desarrollo de la misma (*Phypers y col., 2006; Bidstrup y col., 2002*).

El diagnóstico de la tuberculosis cerebral es complejo, debido principalmente a la presencia de síntomas y signos inespecíficos que dificultan el diagnóstico temprano. Además, las resistencias a los tratamientos actuales, así como la imposibilidad de que los agentes antituberculosos accedan al sistema nervioso central (SNC), llevan al fracaso terapéutico en más de la mitad de los pacientes (*Thwaites y col., 2005*). Así pues, el desarrollo de sistemas que permitan acceder al cerebro supone una herramienta muy prometedora para el tratamiento de esta enfermedad.

2. PATOGÉNESIS DE LA TUBERCULOSIS CEREBRAL

La enfermedad tuberculosa comienza con la entrada del bacilo en los pulmones vía inhalatoria, donde la bacteria coloniza los macrófagos alveolares evadiendo la respuesta inmunitaria del hospedador. Durante la progresión de la enfermedad pulmonar activa, la bacteria puede diseminarse bien por vía linfática o sanguínea a través del sistema circulatorio, llegando así al sistema nervioso central tal y como se muestra en la figura 3.1.

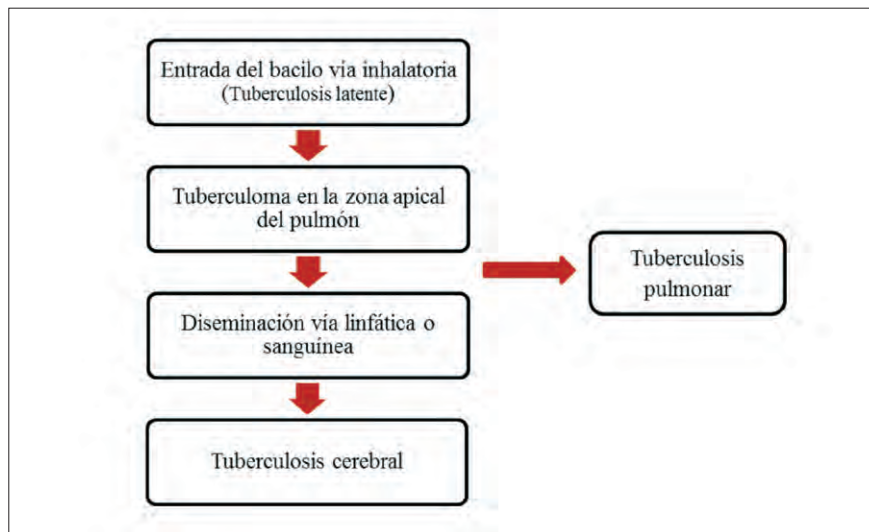


Figura 3.1. Diseminación del bacilo desde el pulmón al sistema nervioso central (SNC).

El mecanismo de patogénesis de la tuberculosis cerebral ha sido elucidado por Arnold Rich y Howard McCordork mediante el análisis de los resultados de autopsias realizadas en pacientes fallecidos por tuberculosis cerebral. En la mayoría de los casos observaron que los pacientes presentaban un foco caseoso en el parénquima cerebral o en las meninges (*Rich y McCordork, 1933*). Así, Rich postuló que esos focos, llamados '*focos de Rich*', se localizaban alrededor de la bacteria en las meninges o en el parénquima cerebral durante la fase inicial de la enfermedad. Posteriormente, la ruptura de dichos focos provocaría la diseminación del bacilo en el espacio subaracnoideo causando la inflamación de las meninges (*Rock y col., 2008*).

La invasión del espacio subaracnoideo trae como consecuencia una gran respuesta inflamatoria (*Mack y col., 2009*). Así, estudios de los niveles de citoquinas en el fluido cerebro espinal de pacientes con tuberculosis cerebral han revelado niveles elevados de IFN- γ y TNF- α (*Curto y col., 2004; Thawaites y col., 2003*). Este último factor, desempeña un papel importante en la formación del granuloma al alterar la permeabilidad de la BHE y favorecer el acceso del bacilo al fluido cerebro-espinal.

2.1. Mecanismo de paso de la bacteria al SNC

El mecanismo por el cual el *M. tuberculosis* accede al sistema nervioso central no está establecido, ya que las meninges y el espacio subaracnoideo están anatómicamente y fisiológicamente protegidos de la circulación sanguínea por la barrera hematoencefálica (BHE). Se postula que el bacilo podría cruzar la barrera hematoencefálica de forma libre (extracelular) o bien, infectando diferentes células como los monocitos y/o neutrófilos (*Ransohoff y col., 2003*).

Se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de elucidar el mecanismo de paso de la bacteria al sistema nervioso central. Jain y col demostraron en un modelo *in vitro* de células endoteliales dispuesta en monocapa, la capacidad de la micobacteria de poder atravesar estas células (*Jain y col., 2006*). La administración intravenosa de *M. tuberculosis* en ratones de experimentación ha demostrado que la entrada del bacilo al cerebro se debe a la formación de un tuberculoma en el parénquima cerebral. Además, un estudio *in vivo* llevado a cabo en ratones con niveles deficitarios de leucocitos CD8 pudo evidenciar que la micobacteria es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y acceder al sistema nervioso central de forma libre, independientemente de macrófagos y leucocitos (*Wu y col., 2000*).

Finalmente, indicar que no está claro si después de la invasión del SNC, la bacteria reside primero en el parénquima cerebral, en las vesículas de la pared o en las células endoteliales que rodean la microvasculatura del cerebro. Sin embargo, la vasculitis asociada a la tuberculosis cerebral y la invasión de las células endoteliales observada *in vitro* puede sugerir que *M. tuberculosis* reside, al menos inicialmente, en las células endoteliales de la microvasculatura (*Thwaites y col., 2000*).

2.2. Respuesta inmunitaria en el sistema nervioso central

El parénquima cerebral presenta un microambiente especializado con el fin de limitar el acceso de sustancias extrañas y evitar así daños neurológi-

cos irreversibles. Así, el acceso del bacilo desde el sistema linfático hacia el parénquima está limitado tanto por la barrera hematoencefálica como por los factores celulares solubles. Cuando *M. tuberculosis* accede al SNC se replica en las células microgliales (macrófagos residentes) (Peterson y col., 1995; Rock y col., 2005; Yang y col., 2007), las cuales tienen una baja capacidad de presentación antigénica y tienden a inducir la apoptosis de células efectoras (Curto y col., 2004; Rock y col., 2004). La internalización del bacilo por parte de estas células es dependiente de receptor CD14 (Peterson y col., 1995), el cual se une a lipopolisacáridos (LPS) con receptores *Toll-Like 4* (TLR-4) y permite secretar diferentes citoquinas y factores proinflamatorios (Spanos y col., 2015). El receptor CD14, junto con la β_2 , integrina CD-18 y TNF- α también están implicados en la formación de las células multinucleadas gigantes observados en autopsias de enfermos infectados por tuberculosis cerebral (Peterson y col., 1996). Como consecuencia de esta infección, las células microgliales del SNC secretan varias citocinas y quimiocinas, incluyendo TNF- α , interleucina-6 (IL-6), IL-1 β , CCL2, CCL5 y CXCL10 (Rock y col., 2005). Estudios recientes ponen de manifiesto que la infección micobacteriana induce efectos inmunosupresores sobre las células microgliales, lo que es más evidente con cepas más virulentas (Curto y col., 2004). A partir de estas observaciones, la microglia ha surgido como células clave para entender la neuropatogénesis de la tuberculosis.

Tal y como se ha indicado previamente, las células microgliales tienen una baja capacidad de presentación antigénica en comparación con los macrófagos, permitiendo explicar la rápida progresión de la enfermedad (Yang y col., 2007).

2.3. Potencial neurotóxico en el cerebro

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc presentes en la mayoría de tejidos humanos entre ellos la BHE. Sus principales funciones son mantener la integridad de la matriz extracelular, modular la interacción entre las células facilitando su migración, así como participar en la angiogénesis del sistema nervioso central.

En la tuberculosis cerebral existe una sobreexpresión de estas proteasas lo que conlleva a un daño en la estructura tisular. Este aumento en los niveles de MMP es atribuido en gran medida a la microglia. Sin embargo, estas células de SNC no son las únicas responsables del aumento de las metaloproteínas, ya que la activación de los monocitos y liberación de citocinas pro-inflamatorias también están relacionados con un aumento de metaloproteínas tipo MMP-1 y MMP-3, responsables del daño tisular (*Green y col., 2013*).

Por otra parte, las señales moleculares usadas por la microglia también son responsables de la neurotoxicidad asociada a esta enfermedad. Así pues, diferentes estudios muestran que la liberación de la fosfolipasas A₂ durante el proceso inflamatorio contribuye también al daño neurológico (*Yang y col., 2007*).

3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA TUBERCULOSIS CEREBRAL

La tuberculosis cerebral puede clasificarse en tres manifestaciones clínicas; la meningitis tuberculosa, el tuberculoma intracraneal, y la aracnoiditis tuberculosa espinal (*Abuhamed y col., 2008*).

3.1. Meningitis tuberculosa

La meningitis tuberculosa es la infección más grave causada por *Mycobacterium tuberculosis*, representa del 5 al 15% de las formas de tuberculosis extrapulmonar siendo causa de muerte o daño neurológico grave en más de la mitad de los pacientes afectados, tanto en países no desarrollados como en países desarrollados (*Hosoglu y col., 2002*). La meningitis tuberculosa se presenta habitualmente como una complicación inmediata o mediata de una infección primaria, y con menos frecuencia se puede desarrollar durante una tuberculosis crónica tratada inadecuadamente. Aparece fundamentalmente en

niños, después de dos o seis meses del inicio de la infección por *M. tuberculosis* (Donals y col., 2004). Así, tras la primoinfección o reactivación se produce una bacilemia, aparición de los bacilos en el torrente sanguíneo, con la consiguiente diseminación de los focos tuberculosos (tuberculomas) al SNC (Thwaites y col., 2009). El crecimiento y la ruptura de un tuberculoma en el espacio subaracnoideo trae como consecuencia el vertido de la proteína tuberculosa, lo que produce una intensa reacción de hipersensibilidad y un proceso inflamatorio en la base del cráneo. En esta localización, esta aracnoiditis localizada en la base del cráneo constituye masas fibrosas que envuelven los pares craneales y los vasos produciendo una inflamación de los mismos con la consiguiente trombosis e infartos. La consecuencia más grave de la infección es la vasculitis en los vasos del círculo de Willis, en el sistema vertebrobasilar y en las ramas perforantes de la arteria cerebral media. Como consecuencia de las zonas infartadas se produce hemiplejía o cuadriplejía. La extensión de la inflamación altera la reabsorción del líquido cefalorraquídeo (LCR) desarrollando una hidrocefalia (Iqbal-Bhigjee y col., 2007).

3.2. Tuberculoma intracraneal

Supone el 15% de los casos de la tuberculosis cerebral y afecta a niños y adultos jóvenes. La manifestación clínica predominante es la formación de tuberculomas que son focos caseosos constituidos por células epiteliales y linfocitos que rodean un centro necrótico y aparece como consecuencia de una diseminación hematógica de la infección de otras partes del cuerpo. Los focos, inicialmente microscópicos, son eventualmente perivasculares y múltiples y, gradualmente, se alargan para formar numerosos tuberculomas pequeños que pueden fusionarse más tarde (Matsumoto y col., 2013; Abuhamed y col., 2008; Idris, 2007). Se localizan fundamentalmente en los hemisferios cerebrales y menos del 50% de los pacientes con tuberculomas tienen el antecedente de tuberculosis siendo las manifestaciones clínicas pulmonares sutiles o ausentes.

3.3. Aracnoiditis tuberculosa espinal

La aracnoiditis tuberculosa espinal es una enfermedad neurológica debilitante causada por el *M. tuberculosis*. Es causada por una inflamación de la membrana aracnoides, una de las tres membranas que rodean el cerebro y la médula espinal. Esta inflamación causa irritación constante, cicatrización y unión de las raíces nerviosas y vasos sanguíneos. Los síntomas se producen de forma progresiva durante semanas y meses. El síntoma predominante de esta enfermedad es crónico y persiste en la región lumbar, las extremidades inferiores o, en casos más graves, en todo el cuerpo. El paciente presenta dolor espinal o radicular, hiperestesia o parestesias, parálisis de motoneurona inferior y disfunción vesical o rectal. La asociación de vasculitis podría producir trombosis e infarto de la médula espinal (Colmenero y col., 2013).

4. BIBLIOGRAFÍA

Abuhamed M., Bo X., Yan C. Central nervous system tuberculomas. *Am. J. Infect. Dis.*, 4: 168-173, 2008.

Bidstrup C., Andersen P. H., Skinhoj P., Andersen A. B. Tuberculous meningitis in a country with a low incidence of tuberculosis: still a serious disease and a diagnostic challenge. *Scand. J. Infect. Dis.*, 34: 811-814, 2002.

Colmenero J. D., Ruiz-Mesa J. D., Sanjuan-Jimenez R., Sobrino B., Morata P. Establishing the diagnosis diagnosis of tuberculous vertebral osteomyelitis. *Eur. Spine J.*, 22: 579, 2013.

Curto M., Reali G., Palmieri F., Scintu M. L., Schivo V., Sogos M. A., Marcialis M., Ennas G., Schwarz H., Pozzi G., Gremo F. Inhibition of cytokines expression in human microglia infected by virulent and non-virulent mycobacteria. *Neurochem. Int.*, 44: 381-392, 2004.

Donals P. R., Schoeman J. L. Tuberculous meningitis. *N. Engl. J. Med.*, 351: 1719-1720, 2004.

Green J. A., Rand L., Moores R., Dholakia S., Pezas T., Elkington P. T. In vitro model of human tuberculosis, monocyte-microglial networks regulate matrix metalloproteinase-1 and -3 gene expression and secretion via a p38 mitogen activated protein kinase-dependent pathway. *J. Neuroinflammation*, 10: 107, 2013.

Hosoglu S., Geyik M. F., Balik I. Predictors of outcome in patients with tuberculous meningitis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 6: 64-70, 2002.

Idris M. N. Tuberculoma of the brain: a series of 16 cases treated with antituberculosis drugs. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 11: 91-95, 2007.

Iqbal-Bhigjee A., Padayachee R., Paruk H., Hallwirth-Pillay K. D., Marais S., Connolly C. Diagnosis of tuberculous meningitis: clinical and laboratory parameters. *Int. J. Infect. Dis.*, 11: 348-354, 2007.

Jacobs R. F., Starke J. R. *Mycobacterium tuberculosis*. En: Long SS, Pickering LK, Prober CG. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, Inc., 791-810, 2003.

Jain S. K., Paul-Satyaseela M., Lamichhane G., Kim K. S., Bishai W. R. *Mycobacterium tuberculosis* invasion and traversal across an in vitro human blood brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis. J. Infect. Dis., 193: 1287-1295, 2006.

Mack U., Migliori G. B., Sester M., Rieder H. L., Ehlers S., Goletti D. Latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*?. Eur. Respir. J., 33: 956-973, 2009.

Matsumoto Y., Aikawa H., Narita S., Tsutsumi M., Yoshida H., Etou H. Intracranial tuberculoma in non-immunosuppressive state. Neurol. Med. Chir., 53: 259-262, 2013.

Peterson P. K., Gekker G., Hu S., Anderson W. B., Teichert M., Chao C. C., Molitor T. W. Multinucleated giant cell formation of swine microglia induced by *Mycobacterium bovis*. J. Infect. Dis., 173: 1194-1201, 1996.

Peterson P. K., Gekker G., Hu S., Sheng W. S., Anderson W. R., Ulevitch R. J., Tobias P. S., Gustafson K. V., Molitor T. W., Chao C. C. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. Infect. Immun., 63: 1598-1602, 1995.

Phypers M., Harris T., Power C. CNS tuberculosis: a longitudinal analysis of epidemiological and clinical features. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 10: 99-103, 2006.

Rana F. S., Hawken M. P., Mwachari C., Bhatt S. M., Abdullah F., L., Power C., Githui W. A., Porter J. D., Lucas S. B. Autopsy study of HIV-1-positive and HIV-1-negative adult medical patients in Nairobi, Kenya. J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 24: 23-29, 2000.

Ransohoff R. M., Kivisakk P., Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 569-581, 2003.

Rich A. R., McCodork H. A. The pathogenesis of tuberculous meningitis. *Bull John Hopkins Hosp.*, 52: 5-37, 1933.

Rock R. B., Gekker G., Hu S., Sheng W. S., Cheeran M., Lokensgard J. R., Peterson P. K. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17: 942-964, 2004.

Rock R. B., Hu S., Gekker G., Sheng W. S., May B., Kapur V., Peterson P. K. *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine and chemokine expression by human microglia and astrocytes: effects of dexamethasone. *J. Infect. Dis.*, 192: 2054-2058, 2005.

Rock R. B., Olin M., Baker C. A., Molitor T. W., Peterson P. K. Central nervous system tuberculosis: pathogenesis and clinical aspects. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21: 243-261, 2008.

Spanos J., Hsu N. J., Jacobs M. Microglia are crucial regulators of neuro-immunity during central nervous system tuberculosis. *Front. Cell Neurosci.*, 9: 1-14, 2015.

Thwaites G. E., Chau T. T., Drobniewski F., McAdam K. Tuberculous meningitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 68: 289-299, 2000.

Thwaites G. E., Hien T. T. Tuberculous meningitis: many questions, too few answers. *Lancet Neurol.*, 4: 160-170, 2005.

Thwaites G. E., Simmons C. P., Quyen N. T., Chau T. T., Mai P. P., Dung N. T., Phu N. H., White N. P., Hien T. T., Farrar J. J. Pathophysiology and prognosis in Vietnamese adults with tuberculous meningitis. *J. Infect. Dis.*, 188: 1105-1115, 2003.

Thwaites G., Fisher M., Hemingway C., Scott G., Solomon T., Innes J. British Infectious Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. *J. Infection*, 59: 167-187, 2009.

Wu H. S., Kolonoski P., Chang Y. Y., Bermudez L. E. Invasion of the Brain and Chronic Central Nervous System Infection after Systemic *Mycobacterium avium* Complex Infection in Mice *Infect. Immun.*, 68: 2979-2984, 2000.

Yang C. S., Lee H. M., Lee J. Y., Kim J. A., Lee S. J., Shin D. M. Reactive oxygen species and p47 phox activation are essential for the *Mycobacterium tuberculosis*-induced pro-inflammatory response in murine microglia. *J. Neuroinflammation*, 4: 27-29, 2007.

IV. GATIFLOXACINO

1. INTRODUCCIÓN

El gatifloxacino (GAT) es un agente antibacteriano perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas (*Bryskier A y Chantot J. F., 1995*) (Tabla 4.1).

Se trata de una quinolona de última generación, aprobado por la FDA para su administración por vía oftálmica en el año 2000 y posteriormente aprobado para su administración por vía oral e intravenosa en el año 2001, comercializado en varios países. Se caracteriza por poseer un amplio espectro de acción contra cocos gram positivos, enterobacterias, bacilos gram negativos y mycobacterias (*Emmerson y col., 2003*).

En la actualidad, se están realizando varios ensayos clínicos en fase III con gatifloxacino para el tratamiento de la tuberculosis (*Merle y col., 2012; Conde y col., 2009*). Diferentes estudios están evaluando la eficacia y seguridad del gatifloxacino en comparación con el tratamiento estándar de 6 meses de duración.

Los resultados obtenidos hasta el momento, parecen indicar que el tratamiento con gatifloxacino permitiría reducir la duración del tratamiento de 6 a 4 meses mostrando eficacia y seguridad similar al tratamiento estándar recomendado por la OMS (*Ruan Q y col., 2016; Merle y col., 2014*).

Primera generación	Segunda generación	Tercera generación	Cuarta generación
Ácido nalidíxico	Ciprofloxacino	Levofloxacino	Balofloxacino
Ácido oxolónico	Enoxacino	Esplarfloxacino	Clinafloxacino
Ácido piperídínico	Flenoxacino	Tosufloxacino	Gatifloxacino
Cinoxacino	Lomefloxacino		Moxifloxacino
Rosoxacino	Norfloxacino		Pazufloxacino
	Ofloxacino		Trovafloracino
	Pefloxacino		

Tabla 4.1. Antibióticos pertenecientes a la familia de las quinolonas.

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos sintéticos químicamente muy heterogéneo. Estructuralmente están constituidas por un ácido 1-sustituido-1,4-dihidro-4-oxopiridin-3-carboxílico combinado con un anillo aromático o heteroaromático.

El ácido nalidíxico fue la primera quinolona utilizada clínicamente, a principios de los años 60, mostrando actividad contra la mayoría de las bacterias gram negativas causantes de infección urinaria, y siendo parcialmente activo contra bacterias gram positivas y pseudomonas. Las modificaciones estructurales han permitido aumentar su espectro de acción y mejorar la biodisponibilidad de estos antibióticos (*Appelbau y col., 2000*). En concreto el gatifloxacino corresponde a la 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(3-metil-1-piperazina)-8-metoxi-3-quinolina carboxílico, con fórmula empírica $C_{19}H_{22}N_3FO_4$ (Figura 4.1).

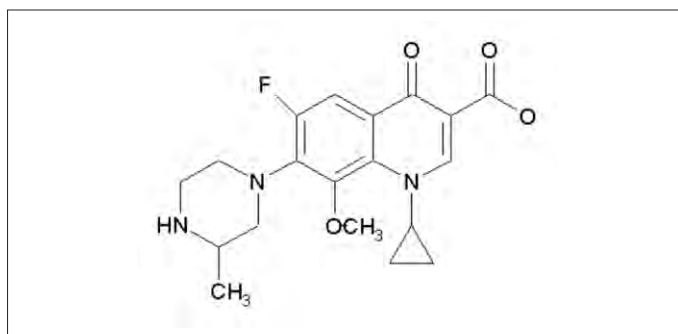


Figura 4.1. Estructura molecular de gatifloxacino.

La presencia del grupo propilo en posición N1 y el grupo metoxi en posición C-8 ha permitido maximizar su actividad antibacteriana y disminuir la resistencia antimicrobiana. La adición de un grupo piperazinilo en la posición C-7 ha permitido minimizar la unión con el receptor GABA, reducir el riesgo de convulsiones y optimizar sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas, prolongando su semivida y proporcionando estabilidad metabólica (*Al-Abdullah, 2012*).

El gatifloxacino tiene un peso molecular 402,42 g/mol. Se presenta con un aspecto de polvo blanco, amarillento con un punto de fusión de 162 °C. La solubilidad de este compuesto es dependiente del pH, con un pK_a 6,43 y un pK_b 8,72 (*Kłosińska-Szumło y col., 2014*). La mayor solubilidad en agua es de 40-60 mg/ml obtenida en un rango de pH de 2-5 a 25 °C. Su solubilidad en etanol es < 1 mg/ml y en DMSO 10 Mm.

3. MECANISMO DE ACCIÓN Y ACCIONES FARMACOLÓGICAS

La actividad antibacteriana de gatifloxacino es el resultado de la inhibición de la ADN girasa o topoisomerasa II en organismos gram negativos y de la topoisomerasa IV en organismos gram positivos (*Perry y col., 2002*). Las topoisomerasas bacterianas son enzimas que mantienen el DNA en un estado adecuado de enrollamiento, tanto en las regiones cromosómicas que se están replicando, como en las que están sin actividad de replicación (*Wang, 1985; Drlica y col., 1997*).

La ADN girasa o topoisomerasa II es un heterotetrámero A_2B_2 con la subunidad A (Gyr A, 97kDa) como responsable del enrollamiento del ADN, ruptura y unión de ADN; y la subunidad B (Gyr B, 90kDa) como la encargada de la hidrólisis de ATP y de la interacción de la subunidad Gyr A y el ATP (*Drlica y col., 1999*). La ADN girasa es una enzima esencial, que está involucrada en la replicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano, introduce superenrollamientos negativos en el ADN y libera la tensión torsional acumulada por los procesos de replicación y transcripción. La topoisomerasa IV presenta un papel clave en la partición del ADN cromosómico durante la división celular bacteriana (*Bhanot y col., 2001*). Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN donde la inhibición de estas funciones conduce a una muerte celular (*Khodursky y col., 1998*).

La resistencia a gatifloxacino se debe principalmente a mutaciones únicas o múltiples en los genes que codifican la ADN girasa bacteriana (GyrA o GyrB) o la Topoisomerasa IV (parC y parE). Sin embargo, existen diferentes estudios en los que se afirma que la presencia de un grupo metoxi en la posición 8 disminuye la capacidad de mutación a este nivel (*Nosova y col., 2013; Harding y col., 2000; Schmitz y col., 2002*).

4. CARACTERÍSTICAS BIOFARMACÉUTICAS Y FARMACOCINÉTICAS

El gatifloxacino se administra principalmente por vía oral, ya que tiene una biodisponibilidad oral del 96%, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre 1 y 2 horas después de su administración. Su absorción no se ve alterada con las comidas (*Devada y col., 2012; Göhler y col., 1998; Mignot y col., 2002*).

Su semivida de 8,4 horas permite una cómoda dosificación cada 24 horas. Presenta una unión a proteínas plasmáticas baja del 20% (*Nakashima y col., 1995*). La distribución es más alta en muchos tejidos que en el suero, particularmente en mucosa bronquial, parénquima pulmonar, mucosa sinusal, ovarios, endometrio y próstata. Puede alcanzar el líquido cefalorraquídeo, inclusive en ausencia de meninges inflamadas.

Presenta un bajo metabolismo hepático y menos del 1% se elimina en la orina como metabolitos tales como etilenediamina y metil etilenediamina. No inhibe al sistema citocromo P450 y los estudios *in vitro* realizados indican que el gatifloxacino no inhibe a CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 o CYP1A2 (*Douglas N. F., 2007*).

Se excreta mayoritariamente inalterado por vía renal, por filtración glomerular y secreción tubular. Un 70% de la dosis aparece inalterado en orina (*Bristol-Myers Squibb Company, 2014*).

5. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

El gatifloxacino es un antibiótico de amplio espectro bactericida. Por ello puede ser utilizado en numerosas infecciones tales como:

- Infecciones del tracto urinario causadas por microorganismos gram-negativos multirresistentes (como *Pseudomonas aeruginosa*) y cocos grampositivos (Dieter y col., 2004).
- Prostatitis: ya que presentan una buena difusión prostática, aunque, cuando las orinas son alcalinas pueden perder eficacia (Suzuki y col., 1998).
- Infecciones óseas y articulares debido a su acción sobre estafilococos y gramnegativos, convirtiéndose en tratamiento de elección en la osteomielitis.
- Infecciones del tracto respiratorio debido a que el gatifloxacino consigue alcanzar altas concentraciones en el tejido bronquial además, de poseer buena actividad *in vitro* contra un gran número de agentes patógenos de vías respiratorias, encontrándose entre los más sensibles *M. tuberculosis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *E. coli*, *S. aureus* y algunas especies de legionella, klebsiella, enterobacterias (Goldstein y col., 1998; Blondeau, 1999; Tasso y col., 2011).
- Infecciones gastrointestinales debido a su buena absorción por vía oral y a alcanzar altas concentraciones intraluminales en tejido, macrófagos e intestino. Además su elevada semivida plástica permite una cómoda administración.
- Infecciones sistémicas graves en pacientes con bacteriemia, sobre todo en las causadas por enterobacterias. En ocasiones, aunque es menos habitual, se emplea en las infecciones causadas por *P. Aeruginosa*.

La actividad del gatifloxacino sobre *M. tuberculosis*, su buena distribución tisular y celular, hace que se esté ensayando en el tratamiento de comunidades con una alta tasa de multirresistencia o en el tratamiento de pacientes con reacciones adversas a los fármacos antituberculosos de primera línea. Comparado con otras fluoroquinolonas el gatifloxacino requiere concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) mucho más bajas que las demás para el tratamiento del *M. tuberculosis* (Perry col., 2002). Por otra parte se están llevando a cabo ensayos clínicos en fase III con gatifloxacino para el tratamiento de la tuberculosis. Los estudios indican que el gatifloxacino permite reducir el tratamiento de seis a cuatro meses en algunos subgrupos de pacientes (Ruan Q y col., 2016; Merle y col., 2014).

6. EFECTOS ADVERSOS

Las fluoroquinolonas presentan importantes efectos adversos a nivel cardiovascular. Diferentes estudios afirman que gatifloxacino puede producir una prolongación del intervalo QTc del electrocardiograma dando lugar a taquicardias e hipertensión. Por ello no puede administrarse conjuntamente con algunos antiarrítmicos (Ball, 2000).

Aunque, uno de los principales y más importantes efectos adversos que presenta es la alteración de los niveles de glucosa en sangre (Suresh y col., 2011), este hecho obliga en algunos casos a la monitorización de estos pacientes. Se han descrito otros efectos secundarios como son (Rubinstein, 2001):

- Fotosensibilización.
- Alteraciones digestivas como dolor abdominal, dispepsias, úlceras orales.
- Alteraciones nerviosas: ansiedad, agitación, temblor, parestesias, vértigo, vasodilatación.
- Alteraciones respiratorias: disnea, faringitis.

7. BIBLIOGRAFÍA

Al-Abdullah E. S. Gatifloxacin. Profiles of drug substances, excipients, and related methodology. Ed. Brittain H. G., 37: 183-243, 2012.

Appelbaum P. C., Hunter P. A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 16: 5-15, 2000.

Ball P. Quinolone-induced QT interval prolongation: a not-so-unexpected class effect. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45: 557-579, 2000.

Bhanot S. K., Singh M., Chatterjee N. R. The chemical and biological aspects of fluoroquinolones: reality and dreams *Curr. Pharm. Des.*, 7: 311-335, 2001.

Blondeau J. M. A review of the comparative in-vitro activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on five new 'respiratory quinolones'. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43: 1-11, 1999.

Bristol-Myers Squibb Company. Princeton, New Jersey, USA Tequin (gatifloxacin) prescribing information, 2004.

Bryskier A., Chantot J. F. Classification and structure-activity relationship of fluoroquinolones. *Drug.* 2: 16-28, 1995.

Conde M. B., Efron A., Loredó C., De Souza G. R., Graça N. P., Cezar M. C., Ram M., Chaudhary M. A., Bishai W. R., Kritski A. L., Chaisson R. E. Moxifloxacin versus ethambutol in the initial treatment of tuberculosis: a double-blind, randomized, controlled phase II trial. *Lancet*. 73:1183-1189, 2009.

Devada S. S., Patel S. D., Patel H. B., Patel N. N., Bhavsar S. K., Thaker A. M. Pharmacokinetics of gatifloxacin in broiler chickens following intravenous and oral administration. *Br. Poult. Sc.*, 2: 257-261, 2012.

Dieter B., Well M., Kinzig-Schippers M., Sörgel F., Ankel-Fuchs D., Kurt G. Urinary bactericidal activity, urinary excretion and plasma concentrations of gatifloxacin (400 mg) versus ciprofloxacin (500 mg) in healthy volunteers after a single oral dose. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 23: 6-16, 2004.

Douglas N. F. Evaluation of gatifloxacin pharmacokinetics and pharmacodynamics in severely ill adults in a medical Intensive Care Unit. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 29: 715-723, 2007.

Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Opin. Microbiol.*, 2: 504-508, 1999.

Drlica K., Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61: 377-392, 1997.

Emmerson A. M., Jones A. M. The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1: 13-20, 2003.

Göhler K., Stahlberg H. J., Guillaume M. Safety, tolerance and food effect after single and multiple oral doses of gatifloxacin, a new fluoroquinolone antibiotic, to healthy Caucasian volunteers. *Antiinfect. Drugs Chemother.*, 1: 68, 1998.

Goldstein F., Bryskier A., Appelbaum P. C., Bauernfeind A., Jacobs M., Schito G. C. The etiology of respiratory tract infections and the antibacterial activity of fluoroquinolones and other oral antibacterial agents against respiratory pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.*, 4: 8-18, 1998.

Harding I., Simpson I. Fluoroquinolones: is there a different mechanism of action and resistance against *Streptococcus pneumoniae*? *J. Chemother.*, 4: 7-15, 2000.

Khodursky A. B., Cozzarelli N. R. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials *J. Biol. Chem.*, 273: 27668-27677, 1998.

Kłosińska-Szmurło E., Pluciński F. A., Grudzień M., Betlejewska-Kielak K., Biernacka J., Mazurek A. P. Experimental and theoretical studies on the molecular properties of ciprofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, sparfloxacin, and gatifloxacin in determining bioavailability. *J. Biol. Phys.*, 4: 335-345, 2014.

Merle C. S., Sismanidis C., Sow O. B., Gninafon M., Horton J., Lapujade O., Lo M. B., Mitchinson D. A., Perronne C., Portaels F., Odhiambo J., Olliaro P., Rustomjee R., Lienhardt C., Fielding K. A pivotal registration phase III, multicenter, randomized tuberculosis controlled trial: design issues and lessons learnt from the Gatifloxacin for TB project. *Trials*, 18: 13-61, 2012.

Merle C. S., Fielding K., Sow O. B., Gninafon M., Lo M. B., Mthiyane T., Odhiambo J., Amukoye E., Bah B., Kassa F., N'Diaye A., Rustomjee R., de Jong B. C., Horton J., Perronne C., Sismanidis C., Lapujade O., Olliaro P. L., Lienhardt C. A four-month gatifloxacin-containing regimen for treating tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, 17:1588-1598, 2014.

Mignot A., Guillaume M., Gohler K. Oral bioavailability of gatifloxacin in healthy volunteers under fasting and fed conditions. *Chemother.*, 48: 111-115, 2002.

Nakashima M., Uematsu T., Kosuge K. Single-and multiple-dose pharmacokinetics of AM-1155, a new 6-fluoro-8 methoxy quinolone, in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 2635-2640, 1995.

Nosova E. Y., Bukatina A. A., Isaeva Y. D., Makarova M. V., Galkina K. Y., Moroz A. M. Analysis of mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes and their association with the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin. *J. Med. Microbio.*, 62: 108-113, 2013.

Perry C. M., Ormrod D., Hurst M. Gatifloxacin: a review of its use in the management of bacterial infections. *Drugs*, 62: 169-207, 2002.

Ruan Q., Liu Q., Sun F., Shao L., Jin J., Yu S., Ai J., Zhang B., Zhang W. Moxifloxacin and gatifloxacin for initial therapy of tuberculosis: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Emerg Microbes Infect.* 24:1038-1050, 2016.

Rubinstein, E. History of quinolones and their side effects. *Chemother.*, 47: 44-48, 2001.

Schmitz F. J., Higgins P. G., Mayer S. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.*, 21: 647-659, 2002.

Suresh K. K., Bhosale S. D., Thulasiram H. V., Kulkarni M. J. Comparative and chemical proteomic approaches reveal gatifloxacin deregulates enzymes involved in glucose metabolism. *J. Toxicol.*, 36: 787-796, 2011.

Suzuki K., Katoh S., Horiba M. Gatifloxacin, a newer quinolone derivative in the treatment of chronic bacterial prostatitis. *Antiinfect. Drugs Chemother.*, 1: 69, 1998.

Tasso L., Andrade C., Costa T. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of the bactericidal activity of free lung concentrations of levofloxacin and gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 4: 307-313, 2011.

Wang J. C. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.*, 54: 665-697, 1985.

V. OBJETIVOS

La tuberculosis constituye un importante problema de salud pública, siendo la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas. Esta enfermedad afecta principalmente a los pulmones, pero también puede desarrollarse en cerebro, siendo la tuberculosis cerebral unas de las manifestaciones más severas en cuanto a su morbilidad y mortalidad. Los tratamientos actuales son complejos y presentan muchas resistencias. En este sentido, el gatifloxacino supone una alternativa eficaz para el tratamiento de tuberculosis resistentes a los tratamientos convencionales.

El objetivo general de esta memoria experimental es mejorar el tratamiento de la tuberculosis mediante la vectorización del gatifloxacino al lugar de acción. Para ello, se plantean dos objetivos principales:

1. Desarrollar una formulación de nanopartículas biodegradables de gatifloxacino, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica para el tratamiento de la tuberculosis cerebral. Dicha formulación, pretende reducir los efectos adversos asociados a los tratamientos convencionales y mejorar la eficacia terapéutica, al dirigir el activo de forma específica al cerebro.
2. Desarrollar una formulación de microesferas biodegradables de gatifloxacino, para ser administradas por vía pulmonar capaz de acceder a los macrófagos alveolares, actuando directamente en el reservorio del *Mycobacterium tuberculosis*. Con esta formulación se pretende reducir las resistencias, acortar la duración del tiempo de tratamiento y disminuir las dosis.

VI. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL GATIFLOXACINO

1. INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas, la cuantificación de principios activos mediante métodos analíticos, es una etapa fundamental para garantizar la calidad del medicamento. Por consiguiente, uno de los principales objetivos de la tecnología farmacéutica es poder determinar, identificar y cuantificar los principios activos y/o sus productos de degradación a través de métodos de análisis rápidos, selectivos y sensibles.

Son numerosos los estudios realizados para la cuantificación de gatifloxacino. En este sentido, podemos destacar los estudios realizados por Aljuffali y col., donde estos autores desarrollaron un método cromatográfico utilizando una fase móvil compuesta por tampón fosfato y acetonitrilo en proporciones (75: 25) (v/v), ajustada a un pH de 3,3 con ácido fosfórico (*Aljuffali y col., 2015*). Salgado y Lopes desarrollaron un método cromatográfico en fase reversa; la fase móvil estaba compuesta por ácido acético: acetonitrilo: metanol (70: 15: 15) (v/v) en condiciones isocráticas a un flujo de 1,0 ml/min (*Salgado y Lopes, 2006*).

También se han desarrollado diferentes métodos para el análisis y cuantificación del gatifloxacino en plasma, importante para la identificación del principio activo en los ensayos clínicos en fase III que actualmente se están realizando. Así pues, Helmy ha desarrollado un método cromatográfico utilizando una fase móvil compuesta por tampón fosfato a pH 3,2 y acetonitrilo (75:25) (v/v) en condiciones isocráticas para la separación de diferentes fluoroquinolonas en plasma (*Helmy, 2013*). Srinivas y col., han desarrollado un método para la cuantificación simultánea de diferentes fluoroquinolonas utilizando una fase móvil compuesta por tampón fosfato a pH 2,5 y acetonitrilo en proporciones (80:20) (v/v) (*Srinivas y col., 2008*).

También se han desarrollado métodos espectrofotométricos para el análisis y cuantificación de este principio activo. En este sentido, Venugopal y Ranendra han desarrollado un método para la identificación del gatifloxacino en dos medios de disolución diferentes, tampón fosfato a pH 7,4 y ácido clorhídrico a pH 1,2 concluyendo que este principio activo es pH dependiente (*Venugopal y Ranendra, 2005*).

Para la determinación analítica del gatifloxacino, tanto en materia prima como en los sistemas nanos y/o microparticulares desarrollados, se han puesto a punto y desarrollado dos métodos analíticos uno, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y otro, por espectrofotometría ultravioleta directa (UV).

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este estudio es la puesta a punto de dos métodos analíticos de cuantificación de gatifloxacino que sean rápidos y selectivos mediante dos técnicas analíticas empleadas. Para ello se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo de un método de cuantificación de gatifloxacino por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para la determinación de la cantidad de principio activo encapsulado en las micro y nanopartículas, así como la determinación y confirmación de la cantidad de fármaco cedido en los estudios de cesión *in vitro*.
2. Desarrollo de un método de cuantificación de gatifloxacino por espectrofotometría UV para la determinación de la cantidad de fármaco cedido en los estudios de cesión *in vitro* realizados.

3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE GATIFLOXACINO

3.1. Método de cuantificación del gatifloxacino por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El método de HPLC utilizado para la cuantificación del gatifloxacino (Santa cruz, Biotechnology, Inc., EE.UU) ha sido el descrito por Santoro y col., adaptado a nuestras condiciones de trabajo (*Santoro y col., 2006*). Dicho método se ha utilizado para la cuantificación de gatifloxacino tanto como

materia prima como en las formulaciones desarrolladas, con el fin de calcular la eficacia de encapsulación y cuantificar la cantidad de principio activo cedido en los ensayos de cesión *in vitro* realizados a partir de las formulaciones elaboradas; micropartículas y nanopartículas.

Se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Perkin-Elmer equipado con un detector de diodo 235C (Perkin-Elmer, Waltham, M. A, EE.UU.), una bomba cuaternaria serie 200 L. C y un inyector automático serie 200. Los datos fueron procesados usando la versión del navegado 6.1.1 (Perkin-Elmer) acoplado a un ordenador HP modelo 1740.

El análisis fue llevado a cabo utilizando una columna de fase reversa C18 Mediterránea Sea (Tecnokroma Coop., España) de 250 mm x 4 mm y tamaño de poro de 5 μm . La columna se mantuvo a $25 \pm 0,5$ °C durante todo el análisis.

La fase móvil utilizada para la cuantificación del gatifloxacino consiste en una mezcla de agua: acetonitrilo (Charlab S. L., España) (80: 20) (v/v) con 0,3% de trietilamina (Fisher Scientific, UK) y ajustada a un pH de 3,3 con ácido fosfórico (Acros Organic, EE.UU.). Antes de ser empleada, la fase móvil es filtrada por filtros de tamaño de poro de 0,45 μm de nylon (Millipore Corp., España) y desgasificada por ultrasonidos durante 25 min. Debido al pH tan ácido utilizado en nuestras condiciones de trabajo, fue necesario estabilizar la columna en contacto con la fase móvil durante 2h antes del análisis cuantitativo del principio activo.

El flujo de la fase móvil seleccionado fue 1 ml/min y el volumen de inyección empleado fue 20 μl . La longitud de onda de detección (λ) empleada fue 295 nm.

Para evaluar la capacidad analítica de este método de cuantificación se han determinado diferentes parámetros, como el factor de asimetría (T) y el número de platos teóricos (N).

El factor de asimetría (T) es una medida de la simetría del pico. Se obtiene de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$T = (W_{0,05}/2f)$$

siendo:

- f la distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del mismo.
- $W_{0,05}$ es la anchura de pico al 5% de la altura del pico.

Un valor de asimetría igual a 1 indica que el pico es simétrico por el contrario, valores de T altos indican que el pico es no simétrico. La asimetría de un pico está relacionada con la precisión del método, en este sentido, el objetivo es conseguir un valor lo más próximo a 1.

El número de platos teóricos (N) es una medida de la eficacia de la columna. Se define como la longitud de columna requerida para que se establezca un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. Es una medida estimada de la agudeza del pico y es característico de cada soluto en cada sistema cromatográfico. Para picos Gaussianos se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$N = 16 [tr/w]^2$$

siendo:

- tr el tiempo de retención del analito.
- W la anchura de pico en su base.

Una columna con un alto número de platos teóricos presentará un pico más estrecho así, cuanto mayor sea el valor de (N), mayor será la eficiencia de la columna.

En la puesta a punto de método de cuantificación del gatifloxacino se ha evaluado la linealidad, exactitud y selectividad del método analítico.

Para ello, se ha aplicados los siguientes tratamiento matemáticos y tests estadísticos.

Linealidad

Análisis de la varianza de la regresión

Para comprobar si los datos se ajustan al modelo lineal propuesto, se realiza un ANOVA de regresión en el que se comparan las variaciones debidas a la regresión frente a las debidas a los errores residuales (experimentales y de ajuste).

- H0 (hipótesis nula): el modelo no es lineal ($p > 0,05$).
- H1 (hipótesis alternativa): el modelo es lineal ($p < 0,05$).

Test de proporcionalidad

Se emplea la prueba estadística de la *t de Student* para demostrar mediante un test de contraste de hipótesis si la ordenada pasa por el origen.

- H0 (hipótesis nula): la ordenada en el origen no difiere significativamente de cero ($p > 0,05$).
- H1 (hipótesis alternativa): la ordenada en el origen si difiere significativamente de cero ($p < 0,05$).

Test de regresión

Mediante esta misma prueba estadística de la *t de Student* se demuestra que la pendiente es significativamente diferente de cero.

- H0 (hipótesis nula): la pendiente no difiere significativamente de cero ($p > 0,05$).

- H1 (hipótesis alternativa): la pendiente sí difiere significativamente de cero ($p < 0,05$).

Para el estudio de linealidad se han utilizado seis concentraciones distintas de gatifloxacino realizadas en 3 días diferentes (4; 8; 16; 24; 32; 40 $\mu\text{g/ml}$) preparadas a partir de una solución madre de 100 $\mu\text{g/ml}$ y diluidas posteriormente con fase móvil.

Determinación de los límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) es la concentración más baja de analito que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar, mientras que el límite de cuantificación (LQ) es la concentración más baja de analito que se puede determinar con una precisión y exactitud aceptables.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se considera como desviación estándar de la respuesta el error de la ordenada en el origen (DE).

- Límite de detección = 3,3. DE/pendiente.
- Límite de cuantificación = 10. DE/pendiente.

Exactitud

La determinación de la exactitud se realiza mediante el análisis por duplicado de muestras preparadas en 3 días consecutivos con las siguientes concentraciones de gatifloxacino: 8; 16; 24; 32; 40 $\mu\text{g/ml}$.

Selectividad

La selectividad es la capacidad para determinar el analito en presencia de otros componentes. Para determinar la selectividad respecto a los excipientes,

se ha valorado soluciones de nano y micropartículas blancas y nano y micropartículas blancas funcionalizadas con polisorbato-80/o labrafil con el fin de determinar si existe interferencias entre los excipientes de las formulaciones desarrolladas y el gatifloxacino. Para ello, se ha calculado la resolución de los picos (R) que es una medida cuantitativa del grado de separación de dos picos. Un valor de 1,5 representa una separación hasta la línea base de ambos picos y un valor de 1,0 representa una resolución del 90%. En algunos casos esto es suficiente para realizar los cálculos del área de los picos (análisis cuantitativo) de forma correcta. Valores de R inferiores a 1 indican solapamiento; valores de R superiores o iguales 1 indican separación de los mismo. Se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\Delta t}{W_B^1 + W_B^2}$$

siendo:

- Δt es la distancia entre el máximo de los dos picos.
- W_B^1 es la medida de la base del pico 1.
- W_B^2 es la medida de la base del pico 2.

3.2. Método de cuantificación del gatifloxacino por espectrofotometría UV

Se ha procedido a la cuantificación de gatifloxacino por espectrofotometría UV (Beckman DU-7, Beckman Coulter, EE.UU.) directa en dos medios diferentes, tampón fosfato (PBS) (Panreac químico S.L., España) ajustado a un pH de 7,4 para realizar la cuantificación del activo a partir de los ensayos de cesión *in vitro* de las microesferas y las nanopartículas elaboradas y en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (PVA) (Acros Organic, EE.UU.) para la cuantificación indirecta de la eficacia de encapsulación del activo en los dos sistemas anteriormente mencionados.

En primer lugar se realiza un espectro de absorción del gatifloxacino en tampón fosfato PBS a pH 7,4 y en una solución acuosa de PVA al 1% obteniéndose un máximo de absorción a 286,5 nm y 295 nm, respectivamente.

Posteriormente, se procede a la preparación de las muestras necesarias para realizar 3 curvas de calibrado. Las concentraciones utilizadas para la preparación de las curvas de calibrado de en PBS fueron: 1; 2; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 $\mu\text{g/ml}$, preparadas a partir de una solución madre de 100 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones utilizadas para la preparación de las curvas de calibrado en PVA al 1% fueron 1; 2; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 $\mu\text{g/ml}$, que fueron preparadas a partir de una solución madre de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Se ha evaluado la linealidad, la exactitud y selectividad del método analítico espectrofotométrico. Con el fin de determinar si el método es lineal y exacto se realizan los tests estadísticos anteriormente descritos.

4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA CUANTIFICACIÓN DEL GATIFLOXACINO

4.1. Resultados de la cuantificación del gatifloxacino por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Con las condiciones de trabajo anteriormente mencionadas, los cromatogramas obtenidos presentan un pico máximo, correspondiente a gatifloxacino, a un tiempo de retención de 14 min. En la figura 6.1 se muestra a modo de ejemplo uno de los cromatogramas obtenidos en la cuantificación del gatifloxacino correspondiente a la concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$. El pico obtenido es estrecho y bien definido.

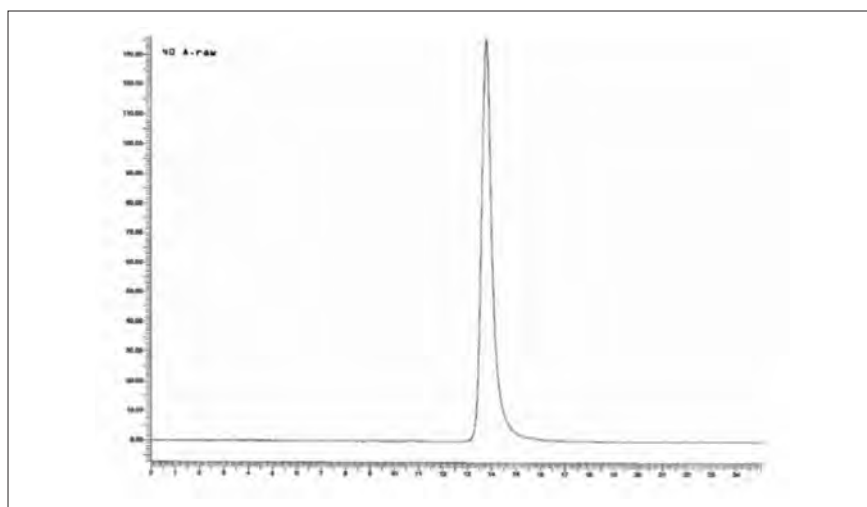


Figura 6.1. Cromatograma correspondiente a gatifloxacino (40 µg/ml).

En la tabla 6.1 se recogen los valores medios de unidades de área (UA) obtenidos para cada una de las concentraciones de GAT empleadas para realizar la curva de calibración del principio activo. Cada muestra ha sido analizada por duplicado.

Concentración (µg/ml)	Unidades de área medios (µUA) ± DE
4	441.084,37 ± 28.722,98
8	873.312,12 ± 30.734,44
16	1.766.245,55 ± 65.917,86
24	2.578.717,67 ± 75.463,81
32	3.432.185,96 ± 36.145,81
40	4.269.035,02 ± 15.674,38

Tabla 6.1. Valores medios de unidades de área (UA) obtenidos a partir de las muestras preparadas de GAT en fase móvil para la obtención de la curva de calibrado por HPLC.

A modo de ejemplo en la figura 6.2 se muestra la representación gráfica de una de las recta de calibrado obtenida utilizada en el estudio estadístico de linealidad.

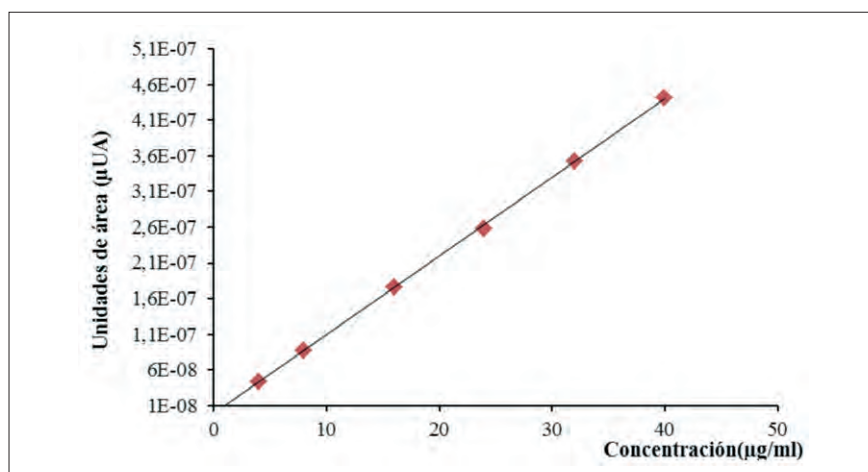


Figura 6.2. Recta de calibrado obtenida con los valores medios de UA mediante el método de cuantificación por HPLC.

En la tabla 6.2 se muestran los resultados de los parámetros de factor de asimetría (T) y número de platos teóricos.

Parámetro	Valor
Factor de asimetría (T)	1
Número de platos teóricos (N)	2.178,4

Tabla 6.2. Resultados correspondientes al factor de asimetría (T) y número de platos teóricos (N).

Al evaluar los resultados obtenidos en el análisis de los parámetros cromatográficos anteriormente descritos, podemos indicar que el pico es simétrico. En nuestras condiciones experimentales, el valor de N obtenido fue 2.178,4 mostrando que la columna utilizada es eficiente para el método analítico de gatifloxacino.

En la tabla 6.3 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de linealidad del método analítico así como los resultados correspondientes al límite de detección y al límite de cuantificación.

Parámetro	Valor
Rango	4-40 µg/ml
Coefficiente de correlación R	0,9992
Coefficiente de correlación R ²	0,9985
ANOVA F de Snedecor	22.006,9 ($p= 0,0000^*$)
Ordenada al origen	29.553,5
Desviación estándar de la ordenada	17.819,5
Estadístico t	1,6584 ($p= 0,1070$)
Pendiente	105.903,7
Desviación estándar de la pendiente	713,9
Estadístico t	148,35 ($p= 0,0000^*$)
Sensibilidad analítica	148,34
Límite de detección	0,507 µg/ml
Límite de cuantificación	1,683 µg/ml

Tabla 6.3. *Parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de la regresión para el método de cuantificación por HPLC.*

La F de Snedecor se obtiene gracias al ANOVA y nos permite analizar las variaciones debidas a la regresión frente a las debidas a los errores residuales (experimentales y de ajuste). La F obtenida es mayor que la F tabulada ($F_{ratio} > F_{tabulada}$), es decir, el valor crítico de $p < 0,05$, por lo que se acepta la hipótesis alternativa H1 que nos indica que nuestros datos se ajustan a un

modelo lineal. Los test de proporcionalidad y de regresión se llevan a cabo mediante un contraste de hipótesis. Si el valor obtenido para t es menor que la t tabulada, para un nivel de significación de 0,05 y grados de libertad de $N-1$, es decir $p > 0,05$, se cumple la hipótesis nula (H_0). En cambio, si el valor obtenido para t es mayor que t tabulada, para un nivel de significación de 0,05 y grados de libertad de $N-1$, es decir $p < 0,05$; se cumple la hipótesis alternativa. Por ello, se puede indicar que:

- Como el p -valor del análisis de regresión múltiple para la ordenada es 0,1070, mayor de 0,05, se cumple la hipótesis nula (H_0), lo que significa que la ordenada en el origen no es significativamente distinta de cero para un nivel de probabilidad del 95%. Es decir, la recta pasa por el punto (0,0).
- Como el p -valor del análisis de regresión múltiple para la pendiente es $p = 0,0000$, menor de 0,05, se cumple la hipótesis alternativa (H_1), lo que significa que la pendiente es diferente significativamente de cero para un nivel de probabilidad del 95%. Es decir, la recta no es paralela al eje de abscisas, por lo que existe pendiente.

Por todo ello podemos indicar que el método de cuantificación de gatifloxacino por cromatografía líquida de alta resolución es lineal y proporcional, pudiendo ser empleado para la determinación de la cantidad de principio activo encapsulado en las micro y nanopartículas, así como en la determinación de la cantidad de fármaco cedido en los estudios de cesión *in vitro*.

Exactitud

La exactitud hace referencia a la capacidad del método analítico para obtener los resultados más próximos al valor real. Para el cálculo de la exactitud, se determinaron los porcentajes de recuperación del gatifloxacino presentes en las muestras, de acuerdo al protocolo previamente descrito. En la tabla 6.4 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la exactitud.

Concentración teórica (µg/ml)	Concentración real (µg/ml)	Porcentaje medio recuperación (%)	Media recuperación (%)	Desviación típica	CV (%)
8	7,73	96,56	98,80	2,07	2,09
8	7,95	99,35			
8	8,06	100,79			
8	8,12	101,54			
8	7,78	97,20			
8	7,79	97,37			
16	16,30	101,87	100,52	1,73	1,72
16	16,25	101,56			
16	15,93	99,56			
16	15,43	102,69			
16	15,82	98,87			
16	15,77	98,59			
24	22,60	94,16	97,01	1,43	1,44
24	23,37	97,37			
24	23,57	98,22			
24	23,40	97,48			
24	23,34	97,24			
24	23,43	97,62			
32	31,93	99,77	100,25	0,87	0,86
32	32,04	100,11			
32	31,85	99,54			
32	32,60	101,88			
32	32,16	100,49			
32	31,91	99,71			
40	40,02	100,05	100,08	0,37	0,367
40	40,30	100,74			
40	40,03	100,07			
40	40,05	100,13			
40	39,92	99,80			
40	39,87	99,68			

Tabla 6.4. Resultados obtenidos en el estudio de exactitud del método de cuantificación de gatifloxacino por HPLC.

En los estudios de exactitud se obtienen porcentajes medios de recuperación de gatifloxacino que oscilan entre el 97,01 y el 100,52%. Los valores de coeficiente de variación son inferiores a 2,5%, lo que permite considerar al método analítico como exacto para el análisis cuantitativo de dicho ingrediente activo.

Selectividad

Para evaluar la selectividad de la técnica analítica respecto a los excipientes de las formulaciones desarrolladas se han valorado soluciones de nano y micropartículas blancas y, nano y micropartículas blancas modificadas con polisorbato-80 o labrafil de acuerdo al protocolo anteriormente descrito.

En la tabla 6.5 se muestran los valores de resolución de los picos obtenidos para los diferentes excipientes respecto al pico del gatifloxacino.

Componente	W	T_r	R_s
Gatifloxacino	1,2	14	–
PLGA	0,3	4,3	12,93
Labrafil	1	5,8	7,45
Polisorbato-80	1	2,3	10,64

Tabla 6.5. Resultados obtenidos en la resolución de los picos cromatográficos.

A continuación en la figura 6.3 se muestran los cromatogramas de los excipientes utilizados en la elaboración de las formulaciones.

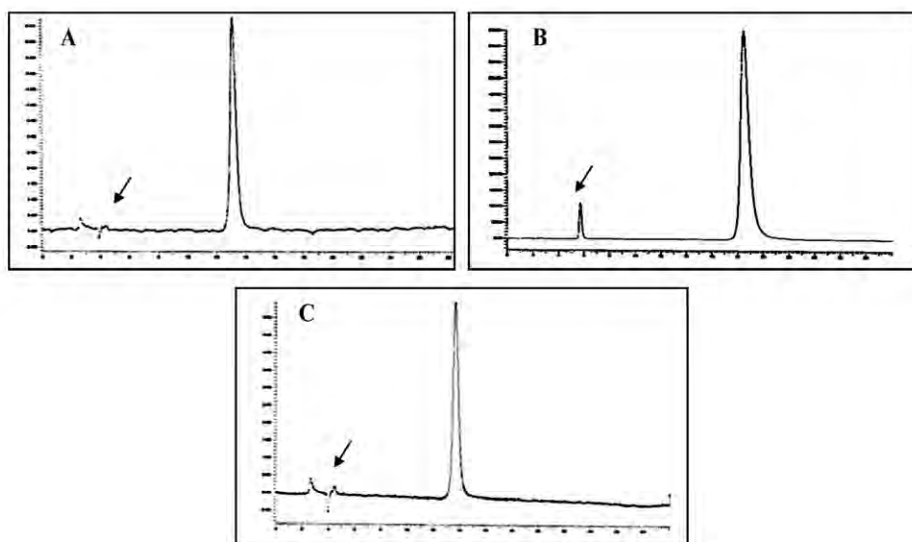


Figura 6.3. *Cromatogramas correspondientes a los excipientes utilizados en la elaboración de las formulaciones (A) PLGA (B) labrafil (C) polisorbato-80.*

Los cromatogramas obtenidos no mostraron ningún pico que pudiera interferir en la cuantificación de gatifloxacino obteniendo en todos los casos una buena resolución de los picos.

4.2. Resultados de la cuantificación del gatifloxacino por espectrofotometría UV en PBS

Para la cuantificación del principio activo cedido en los ensayos de cesión *in vitro* de las microesferas y las nanopartículas, se ha utilizado la espectrofotometría UV directa, con una longitud de onda de 286,5 nm.

Para realizar los ensayos de linealidad se preparan 5 series de 7 concentraciones patrones: 1; 2; 5; 7,5; 10; 12,5 y 15 ($\mu\text{g/ml}$) de gatifloxacino en tampón PBS a pH 7,4. En la tabla 6.6 se muestran los valores medios de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de gatifloxacino ensayadas.

Concentración (µg/ml)	Absorbancia media \pm DE
1	0,065 \pm 0,001
2	0,109 \pm 0,021
5	0,288 \pm 0,019
7,5	0,432 \pm 0,015
10	0,583 \pm 0,017
12,5	0,730 \pm 0,020
15	0,875 \pm 0,016

Tabla 6.6. Valores medios de absorbancia obtenidos a partir de las muestras de GAT preparadas en tampón fosfato para la obtención de la curva de calibrado.

En la figura 6.4 se muestra, a modo de ejemplo, una de la representación gráfica de la recta de calibrado obtenida.

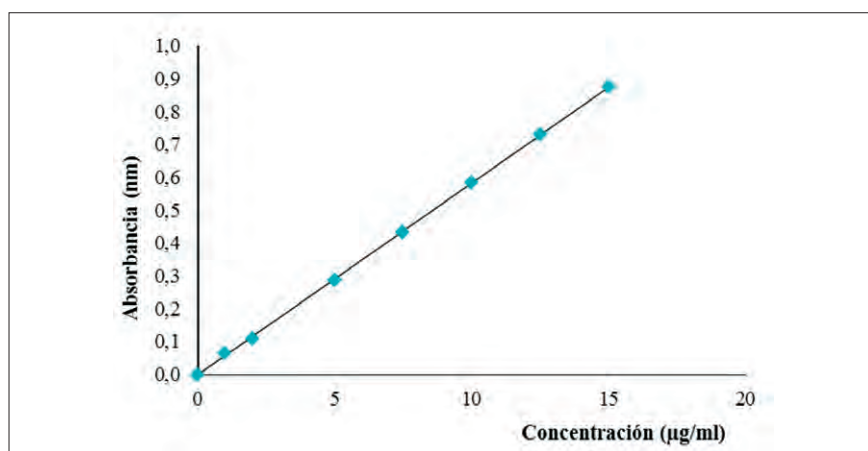


Figura 6.4. Recta de calibrado obtenida con los valores medios de absorbancias mediante el método de cuantificación de espectrofotometría UV en tampón fosfato como medio de disolución.

En la tabla 6.7 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de linealidad del método analítico de espectrofotometría UV utilizando tampón fosfato ajustado a un pH de 7,4 como medio de disolución.

Parámetro	Valor
Rango	1-15 µg/ml
Coefficiente de correlación R	0,9986
Coefficiente de correlación R ²	0,9973
ANOVA F de Snedecor	12.643,8 ($p= 0,0000$)
Ordenada al origen	-0,0005
Desviación estándar de la ordenada	0,0039
Estadístico t	-0,1264 ($p= 0,9001$)
Pendiente	0,058
Desviación estándar de la pendiente	0,0005
Estadístico t	112,44 ($p= 0,0000$)

Tabla 6.7. *Parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de la regresión para el método de cuantificación por espectrofotometría UV utilizando tampón fosfato como medio de disolución.*

Mediante el análisis de varianza de la regresión se puede indicar que los datos se ajustan a un modelo lineal, obteniéndose un valor de $p < 0,05$ ($p = 0,000$) para un nivel de probabilidad del 95%. La evaluación estadística de los resultados muestran una pendiente significativamente diferente de cero obteniéndose un valor de $p < 0,05$ ($p = 0,0000$) para un nivel de probabilidad del 95%. Además, la ordenada en el origen no difiere significativamente de cero, ya que el p valor obtenido es $> 0,05$ (0,9001), para un nivel de probabilidad del 95%.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos indicar que el método empleado resultó ser lineal y proporcional, pudiendo ser empleado para la determinación del principio activo cedido en los estudios de cesión *in vitro*.

El ensayo de exactitud del método de cuantificación del principio activo se ha llevado a cabo con los datos obtenidos para la determinación de la linealidad. Se calculan los porcentajes de recuperación del analito de cada muestra

y los coeficientes de variación de cada grupo. En la tabla 6.8 se recogen los porcentajes medios de recuperación calculados:

Concentración teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje medio recuperado (%)	Recuperación media (%)	Desviación típica	CV (%)
1	1,12	111,81			
1	1,15	114,54	114,09	2,09	1,83
1	1,16	115,91			
2	1,99	99,50			
2	2,14	106,90	103,35	3,71	3,59
2	2,07	103,65			
5	5,22	104,40			
5	5,01	100,29	103,40	2,75	2,66
5	5,28	105,52			
7,5	7,14	95,22			
7,5	7,41	98,82	98,73	3,46	3,51
7,5	7,66	102,14			
10	9,68	96,83			
10	10,23	102,33	100,24	2,97	2,97
10	10,15	101,55			
12,5	12,10	96,82			
12,5	12,66	101,27	100,01	2,79	2,79
12,5	12,74	101,96			
15	14,67	97,81			
15	15,12	100,77	99,88	1,80	1,80
15	15,16	101,07			

Tabla 6.8. Resultados obtenido en el estudio de exactitud del método de cuantificación de GAT por espectrofotometría UV empleando PBS ajustado a pH 7,4 como medio de disolución.

Se obtienen porcentajes medio de recuperación de GAT en las muestras que oscilan entre el 98,73 y el 114,09%. Los coeficientes de variación son inferiores al 4%, lo que demuestra la exactitud del método empleado. Al evaluar los resultados de la especificidad con respecto a los excipientes, se verificó que no existe ninguna interferencia con los demás componentes de las formulaciones desarrolladas.

4.3. Resultados de la cuantificación de gatifloxacino por espectrofotometría UV en PVA

En la tabla 6.9 se recogen los valores de absorbancia en la valoración de gatifloxacino en una solución acuosa de PVA al 1%.

Concentración (µg/ml)	Absorbancia media \pm DE
1	0,03263 \pm 0,002
2	0,10000 \pm 0,019
2,5	0,12967 \pm 0,023
5	0,26983 \pm 0,025
7,5	0,40473 \pm 0,022
10	0,54240 \pm 0,025
15	0,79700 \pm 0,023

Tabla 6.9. Valores medios de absorbancia obtenidos a partir de las muestras de GAT preparadas en PVA para la obtención de la curva de calibrado.

En la figura 6.5, a modo de ejemplo, se muestra la representación gráfica de la recta de calibrado obtenida.

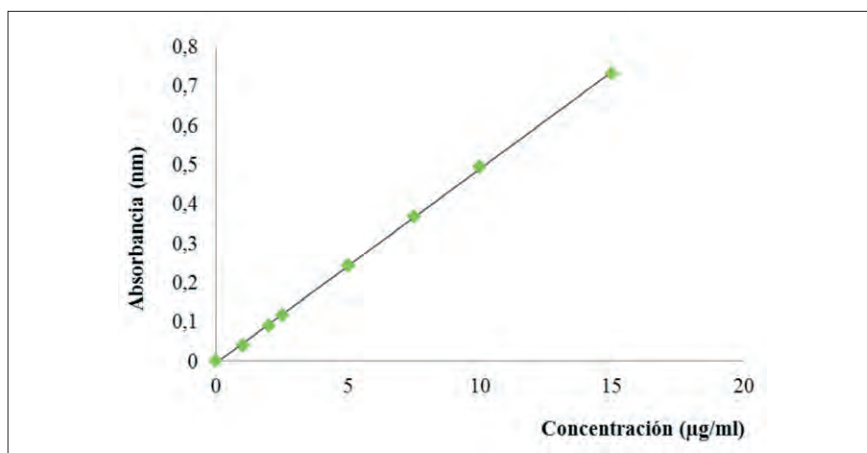


Figura 6.5. Recta de calibrado obtenida con los valores medios de absorbancias mediante el método de cuantificación de espectrofotometría UV en PVA como medio de disolución.

En la tabla 6.10 se recogen los resultados obtenidos en el estudio de linealidad del método de cuantificación de gatifloxacino por espectrofotometría UV empleando PVA 1% como medio de disolución.

Parámetro	Valor
Rango	1-15 µg/ml
Coeficiente de correlación R	0,9980
Coeficiente de correlación R ²	0,9960
ANOVA F de Snedecor	4.805,60 (p= 0,0000)
Ordenada al origen	-0,0099
Desviación estándar de la ordenada	0,0060
Estadístico t	-1,6500 (p= 0,1153)
Pendiente	0,054
Desviación estándar de la pendiente	0,0007
Estadístico t	69,322 (p= 0,0000)

Tabla 6.10. Parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de la regresión para el método de cuantificación por espectrofotometría UV utilizando PVA como medio de disolución.

El valor de p obtenido en el análisis de varianza fue de $p=0,0000$ ($p<0,05$), por lo que se acepta la hipótesis alternativa H_1 que nos indica que nuestros datos se ajustan a un modelo lineal.

El p -valor del análisis de regresión múltiple para la ordenada es 0,1153, mayor de 0,05, la recta pasa por el punto (0,0). Como el p -valor del análisis de regresión múltiple para la pendiente es $p=0,0000$, por lo que la pendiente difiere significativamente de cero.

Al evaluar los resultados obtenidos, podemos indicar que el método de cuantificación de gatifloxacino en el rango de concentraciones estudiadas es lineal y proporcional, pudiendo ser empleado para la determinación analítica del gatifloxacino en PVA.

El ensayo de exactitud del método de cuantificación del principio activo se ha llevado a cabo con los datos obtenidos para la determinación de la linealidad. Se calculan los porcentajes de recuperación del analito de cada muestra y los coeficientes de variación de cada grupo.

En la tabla 6.11 se recogen los porcentajes medios de recuperación calculados.

Concentración teórica (µg/ml)	Concentración real (µg/ml)	Porcentaje recuperado (%)	Porcentaje medio recuperación (%)	Desviación típica	CV (%)
1,00	0,94	94,00			
1,00	0,98	98,23	96,33	2,08	2,16
1,00	0,97	97,63			
2,00	2,05	102,50			
2,00	2,10	105,00	105,83	3,82	3,61
2,00	2,20	110,00			
2,50	2,30	91,85			
2,50	2,35	94,14	94,00	2,08	2,21
2,50	2,40	96,00			
7,50	7,44	99,26			
7,50	7,38	98,45	101,93	5,33	5,23
7,50	8,10	108,06			
10,00	9,90	99,02			
10,00	9,94	99,35	100,59	0,24	0,24
10,00	10,34	103,41			
15,00	14,62	97,45			
15,00	14,65	97,64	99,17	2,81	2,83
15,00	15,36	102,41			

Tabla 6.11. Resultados obtenidos en el estudio de exactitud del método de cuantificación de GAT por espectrofotometría UV empleando PVA al 1% como medio de disolución.

Los porcentajes medios de recuperación de GAT en las muestras oscilaron entre el 94 y el 105,83%. Los coeficientes de variación son inferiores al 6%, lo que demuestra la exactitud del método empleado.

Al evaluar los resultados de la especificidad con respecto a los excipientes, se verificó que no existe ninguna interferencia con los demás componentes de las formulaciones desarrolladas.

5. BIBLIOGRAFÍA

Aljuffali A., Kalam A., Sultana Y., Imran A., Alshamsan A. Development and validation of stability indicating high performance liquid chromatography method to analyze gatifloxacin in bulk drug and pharmaceutical preparations. Saudi Pharm., J. 23: 85-94, 2015.

Helmy A. Simultaneous quantification of linezolid, tinidazole, norfloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and gatifloxacin in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies in human volunteers. Ther. Drug Monit., 35: 770-777, 2013.

Salgado H. R., Lopes C. C. Determination of gatifloxacin in bulk and tablet preparations by high-performance liquid chromatography. J. AOAC Int., 89: 642-645, 2006.

Santoro M. I., Kassab M., Singh K., Kedor-Hackmam R. M. Quantitative determination of gatifloxacin, levofloxacin, lomefloxacin and pefloxacin fluoroquinolonic antibiotics in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography. J. Pharm. Biomed., 40: 179-184, 2006.

Srinivas N., Narasu L., Shankar B. P., Mullangi R. Development and validation of a HPLC method for simultaneous quantitation of gatifloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin using levofloxacin as internal standard in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. Biomed. Chromatogr., 22: 1288-1295, 2008.

Venugopal K., Ranendra N. S. New, simple and validated UV-spectrophotometric methods for the estimation of gatifloxacin in bulk and formulations. Il Fármaco, 60: 906-912, 2005.

VII. NANOPARTÍCULAS DE GATIFLOXACINO

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis cerebral es una de las manifestaciones más serias causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de altos niveles de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo. El tratamiento actual es complejo, y no siempre efectivo debido a las resistencias desarrolladas ante los tratamientos con antibióticos convencionales así como, por la imposibilidad de los fármacos de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y acceder al sistema nervioso central (SNC).

La barrera hematoencefálica (BHE) presenta una permeabilidad muy restringida del endotelio vascular al paso de sustancias. Las membranas luminal y abluminal del endotelio cerebral presentan uniones estrechas de menos de 200 nm, además, la ausencia de canales paracelulares y transcelulares reduce la posibilidad de paso a través de la BHE para la mayoría de las sustancias (*Pardridge W. M., 2007*). Solamente el agua, gases y determinadas moléculas liposolubles pequeñas (400-600 Da) son capaces de atravesar la barrera. El resto de las sustancias, necesitan el uso de receptores o transportadores específicos para conseguirlo. Por otro lado, algunas moléculas cuando alcanzan el cerebro, actúan como sustratos de la glicoproteína P (P-gp) regresando a la circulación periférica. Este mecanismo de eflujo supone una protección para el cerebro contra sustancias tóxicas, pero restringe el transporte de muchos fármacos terapéuticamente importantes.

Las fluoroquinolonas de nueva generación (FQS), entre ellas el gatifloxacino, son fármacos antituberculosos de segunda línea, que han demostrado ser más eficaces en el tratamiento de la MDR-TB que los fármacos convencionales (*Zhang y col., 2014*). Sin embargo, la mayoría de estos agentes no consiguen atravesar la BHE y no pueden ser utilizados para el tratamiento de la tuberculosis cerebral. En la actualidad, la nanotecnología supone una herramienta eficaz para conseguir mejorar el paso a través de BHE de muchos fármacos. Así, las nanopartículas poliméricas elaboradas con polímeros biodegradables

como el poliláctico-co-glicólico (PLGA), con tamaños alrededor de 250 nm consiguen alcanzar diferentes zonas del cerebro desapareciendo del lugar de acción una vez se haya liberado el fármaco (*Hillaireau H. y col., 2009; Suchlfart S. y col., 2012*). No obstante, las cantidades que alcanzan el lugar de acción son bajas.

Diversos autores han puesto de manifiesto que el recubrimiento de nanopartículas con polisorbato 80 favorece su transporte a través de la BHE (*Sun y col., 2015*). Se cree que las apolipoproteínas A-I y E son adsorbidas en la superficie de las nanopartículas recubiertas con agentes surfactantes después de su administración intravenosa. Las apolipoproteínas (Apo) imita a la proteína de baja densidad (LDL), lo que permite que estas nanopartículas sean reconocidas por los receptores expresados en la superficie de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (*Wohlfart y col., 2012; Michaelis y col., 2006; Steiniger y col., 2004; Sumner y col., 2005*) permitiendo su captación y paso al SNC a través de la endocitosis mediada por receptor (*Ambruosi y col., 2005*). Otros autores han indicado que las nanopartículas recubiertas con otros surfactantes más hidrófilos no interactúan con la APO E y su paso es menor (*Brigger I. y col., 2004*).

Por otra parte, una de las primeras limitaciones que encuentran estos nanosistemas es que pueden ser recogidos como partículas extrañas, por lo que son opsonizadas y eliminadas del torrente circulatorio antes de que puedan cumplir su función. Este proceso de fagocitosis está relacionado con el tamaño y las características superficiales de las mismas. Por tanto, con el fin de prolongar el tiempo de permanencia de estos sistemas poliméricos en la circulación, se desarrollan estrategias con el objetivo de evitar la acción de los macrófagos y suprimir o paliar la opsonización.

Con el fin de favorecer el paso de las nanopartículas a través de la BHE y aumentar su semivida plasmática, se han elaborados nanopartículas funcionalizadas modificando sus propiedades superficiales. Dicha funcionalización se logra al introducir átomos o grupos funcionales en la superficie de las nano-

partículas logrando una distribución más selectiva de las mismas en el tejido diana. La inclusión de gatifloxacino en dichas nanopartículas funcionalizadas, constituirá una buena estrategia para el tratamiento de la tuberculosis cerebral, al mejorar el paso del fármaco a través de la BHE y, por tanto, su acceso al parénquima cerebral.

2. OBJETIVO

El objetivo planteado ha sido desarrollar una formulación de nanopartículas biodegradables de gatifloxacino capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, para el tratamiento de la tuberculosis cerebral. Dicha formulación pretende reducir los efectos adversos asociados a los tratamientos convencionales y mejorar la eficacia terapéutica, al dirigir el activo de forma específica al cerebro. Para alcanzar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Obtener y caracterizar nanopartículas de GAT elaboradas con un polímero biodegradable, PLGA RG® 502.
2. Obtener y caracterizar nanopartículas funcionalizadas de GAT preparadas con PLGA RG® 502 y modificadas con polisorbato 80 o labrafil.
3. Evaluar *in vivo* el paso a través de la BHE de las formulaciones de nanopartículas elaboradas con los dos agentes surfactantes (polisorbato 80 y labrafil).
4. Evaluar la biodistribución *in vivo* de las formulaciones en los órganos más relevantes para la tuberculosis.
5. Seleccionar la formulación más adecuada para favorecer el paso a través de la BHE.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Elaboración de las nanopartículas de PLGA cargadas con gatifloxacino sin funcionalizar

Las nanopartículas se han elaborado mediante el método de nanoprecipitación. Para ello se pesan 50 mg del polímero PLGA (Resomer® 502, Evonik, Alemania) y 5 mg de GAT (Santa Cruz, Biotech., EE.UU.) que se disuelve en 4 ml de acetona (Fisher Scientific, UK) bajo agitación en vórtex durante 2 minutos hasta conseguir una mezcla homogénea. La dispersión formada se añade con una pipeta *pasteur*, gota a gota, sobre 12 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) al 1% (Acros Organic, EE.UU.). Dada la comprometida solubilidad del gatifloxacino en medio acuoso, la solución de PVA es ajustada previamente a un pH de 8,65 con una solución acuosa de fosfato sódico dihidratado (Panreac Química S. A., España), con el objetivo de aumentar la afinidad del principio activo por la fase interna y así favorecer su encapsulación, evitando su difusión hacia la fase acuosa. La suspensión de nanopartículas se mantiene en agitación magnética durante 15 minutos. Para eliminar la acetona, dicha suspensión se lleva al rotavapor (IKA Labortechnik, Alemania; Bomba Buchi Copp., Suiza) durante 2 horas a temperatura ambiente utilizando una presión de 70 mbar.

Una vez eliminado el disolvente orgánico, la suspensión de nanopartículas se centrifuga durante 40 minutos a 15.000 rpm (Avanti J-301 Beckman Coulter®, EE.UU.). Estas se lavan 3 veces con agua destilada y a continuación se incorpora como crioprotector, una solución acuosa de sacarosa al 3% (Panreac, Química S. A., España). Finalmente se liofilizan durante 24 horas (Flexi-Dry MP™, FTS® Systems, EE.UU.).

En la figura 7.1 se muestra un esquema del proceso de elaboración de las nanopartículas por el método de nanoprecipitación.

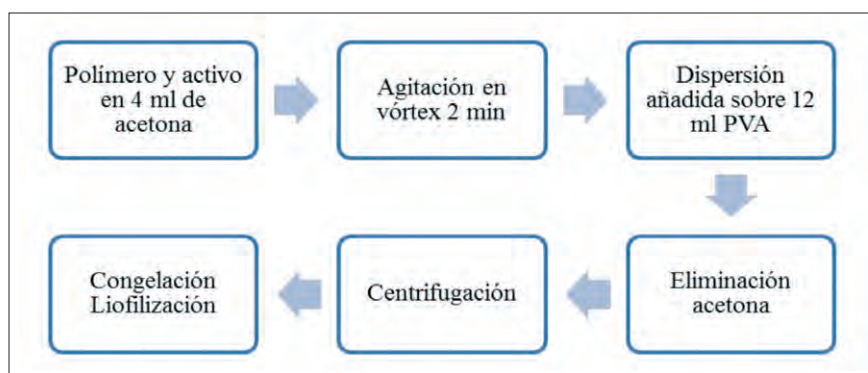


Figura 7.1. Método de elaboración de las nanopartículas por la técnica de nanoprecipitación.

De acuerdo con el procedimiento anteriormente indicado, se han elaborado dos formulaciones: nanopartículas no cargadas (formulación NP-1), y nanopartículas cargadas con GAT (formulación NP-2) (Tabla 7.1).

Formulación	PLGA	GAT	Polisorbato 80	Labrafil
NP-1	50 mg	–	–	–
NP-2	50 mg	5 mg	–	–
NP-3	50 mg	–	1%	–
NP-4	50 mg	5 mg	1%	–
NP-5	50 mg	–	–	3,5 mg
NP-6	50 mg	5 mg	–	3,5 mg

Tabla 7.1. Formulaciones de nanopartículas elaboradas.

3.2. Elaboración de nanopartículas de PLGA funcionalizadas con polisorbato 80

Las nanopartículas modificadas con polisorbato 80 (Tween 80™, Fisher Chemical, UK) se han elaborado siguiendo el protocolo descrito anteriormente

(Figura 7.1), sustituyendo la dispersión de PVA al 1% por una solución de polisorbato 80 (1%)/PVA (1%).

Por este procedimiento se han preparado dos formulaciones: nanopartículas de PLGA no cargadas modificadas con polisorbato 80 (formulación NP-3) y nanopartículas de PLGA cargadas con GAT y modificadas con polisorbato 80 (formulación NP-4) (Tabla 7.1).

3.3. Elaboración de nanopartículas de PLGA modificadas con labrafil

Las nanopartículas modificadas con labrafil (Labafil® M1944 CS, Gattefossé, Francia) se han elaborado siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Figura 7.1) incluyendo 3,5 mg de labrafil junto con el polímero. De esta manera se han preparado dos formulaciones: nanopartículas no cargadas modificadas con labrafil (formulación NP-5) y nanopartículas cargadas con GAT modificadas con labrafil (formulación NP-6) (Tabla 7.1).

3.4. Elaboración de nanopartículas de rodamina para la realización de los estudios *in vivo*

Para los estudios *in vivo* de paso a través de BHE, es necesario elaborar nanopartículas con un agente fluorescente: rodamina 123 (Rh) (formulación NPR-1). Para ello, se utiliza el protocolo indicado en la figura 7.1 incorporando 2,5 mg de rodamina junto con el polímero (50 mg de PLGA 502) en la fase orgánica. Además, se han preparado nanopartículas cargadas con rodamina funcionalizadas con polisorbato 80 (formulación NPR-2) o con labrafil (formulación NPR-3) empleando el protocolo descrito en la obtención de nanopartículas funcionalizadas.

En la tabla 7.2 se muestran las formulaciones de rodamina preparadas.

Formulación	PLGA	Rodamina	Polisorbato 80	Labrafil
NPR-1	50 mg	2,5 mg	–	–
NPR-2	50 mg	2,5 mg	1%	–
NPR-3	50 mg	2,5 mg	–	3,5 mg

Tabla 7.2. *Formulaciones de nanopartículas cargadas con rodamina para los estudios in vivo.*

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

4.1. Características morfológicas de las nanopartículas desarrolladas

Difracción de rayos láser

Se ha determinado la distribución de tamaños de cada una de las formulaciones elaboradas, antes y después de la liofilización, mediante la técnica de difracción de rayos láser utilizando el equipo Zetatrac® Ultra (Microtac, Inc., EE.UU.). El diámetro medio de las nanopartículas obtenidas se expresa como diámetro volumen y la distribución de tamaños se representa gráficamente mediante curvas distributivas de volumen.

Con el objetivo de determinar la dispersibilidad de la distribución de tamaños que presentan todas las formulaciones desarrolladas y evaluar si la técnica empleada es adecuada se ha calculado el span y el índice de polidispersión (PI).

Los valores de span de cada una de las distribuciones obtenidas se han calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Span} = \frac{\text{Percentil 90-Percentil 10}}{\text{Percentil 50}}$$

Un valor elevado de span indica una distribución heterogénea de tamaños. Se considera que una población de nanopartículas es monodispersa cuando se obtienen valores de span inferiores a 1.

El índice de polidispersión se ha determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PI} = \frac{\text{SD}}{\text{Tamaño medio}}$$

El índice de polidispersión nos indica la anchura y distribución de tamaños moleculares y es la relación entre el promedio en peso y en número. Valores de PI comprendidos entre 0,1-0,5 indican que la muestra es monodispersa sin embargo, valores por encima de 0,7 indican que la muestra es polidispersa con una distribución de tamaños amplia.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis morfológico se realizó por microscopía electrónica de barrido (SEM, Jeol, JEM-6335, Japón). Este estudio permite determinar la forma, homogeneidad de tamaño, estado de agregación de las partículas, distribución del principio activo, y presencia de poros en su superficie; aspectos que pueden condicionar la liberación del principio activo.

Para ello las muestras fueron fijadas mediante cinta adhesiva de fibra de carbono a unos soportes o portamuestras y recubiertas con una capa de oro coloidal, agente conductor, de aproximadamente 15 nm de espesor empleando para ello 3 minutos (*Gaumet y col., 2008*). Una vez preparadas las muestras, se introducen en el microscopio electrónico de barrido, se observan diferentes campos a distintos aumentos y se toman las fotografías.

Se ha realizado el estudio morfológico de las siguientes formulaciones desarrolladas; nanopartículas de PLGA inertes cargadas y no modificadas (NP-1 y NP-2), nanopartículas de PLGA inertes y cargadas modificadas con polisorbato 80 (NP-3 y NP-4) y nanopartículas de PLGA inertes y cargadas modificadas con labrafil (NP-5 y NP-6), así como de las formulaciones desarrolladas para los estudios *in vivo*, nanopartículas cargadas de rodamina no modificadas (NPR-1) y nanopartículas cargadas con rodamina modificadas con polisorbato-80 y labrafil (NPR-2, NPR-3, respectivamente).

4.2. Propiedades superficiales

Se ha determinado el potencial zeta de las diferentes formulaciones de nanopartículas mediante la técnica de dispersión de luz, utilizando para ello el equipo Zetasizer Nano S[®] (Malvern Instrument's, UK) utilizando para la lectura de las muestras una célula capilar Capillary cell enhancer[®] (Malvern Instrument's, UK). Para ello se preparó una suspensión de las formulaciones liofilizadas (5 mg) en agua destilada (50 ml). Antes de la lectura, cada muestra se mantuvo en sonicación durante 5 minutos con el fin de minimizar posibles agregaciones.

El potencial Z fue determinado en las siguientes formulaciones; nanopartículas de PLGA inertes modificadas y no modificadas (NP-1, NP-3 y NP-5) y nanopartículas de PLGA cargadas con GAT no modificadas (NP-2) y modificadas (NP-4 y NP-6).

4.3. Determinación del rendimiento del proceso y eficacia de encapsulación

La determinación del rendimiento del proceso de elaboración de las formulaciones se realiza pesando las nanopartículas liofilizadas y determinado el porcentaje respecto al teórico (P/P).

La eficacia de encapsulación se ha determinado en las nanopartículas cargadas con gatifloxacino no modificadas y modificadas (NP-2, NP-4 y NP-6) y en las nanopartículas de rodamina no modificadas (NPR-1) y modificadas (NPR-2 y NPR-3).

Para la determinación del contenido de principio activo de las nanopartículas cargadas con gatifloxacino, se procede de la siguiente manera: se pesan 10 mg de la formulación y se disuelven en 1 ml de diclorometano bajo agitación en vórtex para proceder a la ruptura del sistema polimérico. A continuación, a las muestras se les añade 15 ml de etanol con el fin de disolver el principio activo y conseguir la precipitación total del polímero. Posteriormente, se someten a centrifugación durante 5 min a 5.000 rpm. Este proceso se repite 5 veces para conseguir la completa extracción del principio activo. Finalmente, las muestras se filtran a través de un filtro de 0,45 µm de polipropileno (Teknokroma Analítica, SA, España). El contenido de GAT encapsulado se determina por cromatografía líquida de alta resolución tal como se ha indicado previamente en el capítulo 6 de esta memoria experimental. La cuantificación de las formulaciones se ha realizado por triplicado para las diferentes formulaciones cargadas con gatifloxacino.

La eficacia o rendimiento de encapsulación (EE) se calcula partir de la relación entre el principio activo que realmente ha sido encapsulado y aquel en disposición de ser encapsulado, utilizando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad p.a obtenido experimentalmente}}{\text{Cantidad p.a teórico}} \times 100$$

La eficacia de encapsulación también se puede expresar como mg de principio activo (p.a)/100 mg de nanopartículas.

Para calcular la cantidad de principio activo teórico en 10 mg de nanopartículas, se ha considerado la cantidad de los excipientes incluidos en la matriz polimérica. En el caso del polisorbato 80 hemos calculado la cantidad teórica

de polisorbato presente en la fase interna utilizando su coeficiente de reparto (agua/acetona) previamente calculado por nosotros (*Vera y col., 2014*). Dicho coeficiente de partición se determinó teniendo en cuenta su solubilidad en acetona (10 g/100 ml) y en agua (5 g/100 ml). El valor del coeficiente de partición agua/acetona obtenido resultó ser de ($K_r = 0,5$). En el caso de la formulación modificada con labrafil (NP-6) se ha considerado en el cálculo de la cantidad teórica, la cantidad de labrafil incorporada en la fase interna.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos obtenido por HPLC, se procede a la cuantificación de GAT encapsulado de forma indirecta, por la técnica de espectrofotometría UV tal como se muestra en el capítulo 6 de la presente memoria experimental. Así, la suspensión de nanopartículas en PVA exenta de acetona se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 min y se determinó el contenido del activo no encapsulado en el sobrenadante. El porcentaje de encapsulación se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$EE (\%) = \frac{\text{p.a en fase orgánica} - \text{p.a en el sobrenadante}}{\text{Polímero teórico}} \times 100$$

El contenido de rodamina de las formulaciones desarrolladas para los estudios *in vivo* se determinó disolviendo 5 mg de cada una de las formulaciones (NPR-1, NPR-2, NPR-3) en 6 ml de diclorometano, con el fin de romper el sistema polimérico. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 5.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se diluyó con diclorometano y su contenido en rodamina se cuantificó por fluorimetría utilizando un espectralfluorímetro, Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, CA, EE.UU.) a una longitud de onda de excitación de 351 nm y una longitud de onda de emisión 578 nm.

4.4. Ensayo de cesión

Los ensayos de cesión se llevan a cabo en un baño termostatzado Memmert WNB 45 (Mettmert®, Alemania).

Para ello, se pesan 20 mg de las nanopartículas de GAT (NP-2, NP-4 y NP-6) que se suspenden en 3 ml de tampón fosfato ajustado a pH 7,4. Este volumen resulta adecuado para mantener las condiciones “*sink*” durante todo el ensayo.

Las muestras se introducen en un baño termostatzado a $37 \pm 0,1$ °C con un movimiento constante de 100 rpm. La toma de muestras se realiza a intervalos de tiempo preestablecidos. Con el objetivo de no arrastrar las nanopartículas en el muestreo, las muestras se centrifugan a una velocidad de 5.000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se extrae 2,5 ml del medio con una aguja de 30 G acoplada a una jeringa y se renueva el mismo volumen con una solución tampón recién preparada para obtener un volumen final de 3 ml. A continuación las muestras se filtran a través de filtros de 0,45 µm de PVDF (Teknokroma Analítica, SA, España) y el contenido de principio activo se cuantifica por HPLC, tal como se ha indicado en el capítulo 6. Los estudios de cesión *in vitro* de GAT se han realizado por triplicado.

4.5. Evaluación *in vivo* del paso de nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica

Los estudios *in vivo* se han llevado a cabo utilizando ratas Wistar macho (Harlan, Francia) con pesos comprendidos entre 250 y 300 g. Son mantenidas a una temperatura de 22 ± 2 °C y sometidas a ciclos de luz-oscuridad (cada 12 h). Las ratas son alimentadas con piensos y agua *ad libitum* y mantenidas en las condiciones indicadas durante una semana previa a la realización de los ensayos para su adaptación. Todos los experimentos en animales han sido aprobados por el Comité Ético de experimentación de la Universidad Complutense de Madrid, y llevados a cabo de acuerdo a la normativa europea (010/63/UE).

Las ratas se dividen en 8 grupos de 2 ratas cada uno administrándose 50 mg/kg de peso de nanopartículas cargadas con rodamina no modificadas (NPR-1) y modificadas (NPR-2 y NPR-3) suspendidas en suero salino. Como control, grupo 0A y 0B, se administró 0,5 mg de Rh/kg de peso (Tabla 7.3).

Para la realización de los ensayos, los animales fueron anestesiados con isofurano. Posteriormente, se llevó a cabo la administración de las formulaciones correspondientes. A los 30 y 60 min de la administración de las nanopartículas, de acuerdo al protocolo indicado en la tabla 7.3, los animales fueron sacrificados y el cerebro hígado y pulmón fueron extraídos para su análisis.

Grupo	Formulación	Tiempo de sacrificio (min)
0A	Solución Rh	30
1	NPR-1	30
2	NPR-2	30
3	NPR-3	30
0B	Solución Rh	60
4	NPR-1	60
5	NPR-2	60
6	NPR-3	60

Tabla 7.3. *Protocolo utilizado en los estudios de biodistribución.*

Los cerebros extraídos se introducen en isopentano y se congelan a una temperatura de -80 °C. Posteriormente, se obtienen cortes histológicos de 25 µm de espesor, utilizando un criotomo (Leica CM 1850, Alemania). Las muestras obtenidas se fijan con formaldehído al 4% durante 5 minutos, se lavan con PBS 3 veces y se tiñen con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) durante 1 minuto. El DAPI es un agente fluorescente que pertenece al grupo de los colorantes de indol y es usado para la tinción nuclear ya que se une a los grupos de adenina y timina del ADN. El complejo DAPI/DNA se excita a una longitud de onda de 460 nm y de emisión de 500 nm, emitiendo fluorescencia azul. Posteriormente, las muestras se secan y se adiciona xileno con el fin de deshidratar las muestras. Se añade DPX, resina acrílica con base de xileno, utilizado como

medio de montaje anhidro para la visualización de compuestos fluorescentes y se dejan 24 horas en oscuridad.

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la rodamina en el cerebro

La intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de rodamina se observa por microscopía confocal (Olympus IX51, Olympus Corporation, Japón) utilizando como longitud de onda de excitación 540 nm y de emisión de 570 nm. Las imágenes obtenidas fueron tratadas con el programa *Image J* (1.47 v). A partir de las microfotografías obtenidas mediante microscopía confocal, se procede a la cuantificación de la rodamina. Para ello, cada imagen es analizada mediante dicho programa, expresando los datos como un promedio de la intensidad de fluorescencia medida en cada una de las imágenes analizadas.

Evaluación de neurotoxicidad

Con el objetivo de realizar estudios de toxicidad y determinar por tanto la viabilidad neuronal, se ha llevado a cabo una determinación cuantitativa de las neuronas vivas presentes en el hipocampo tras la administración de las formulaciones anteriormente mencionadas (NPR-1, NPR-2 y NPR-3). Dado que el DAPI se une de forma selectiva a las cadenas dobles del DNA de las células vivas, es posible realizar una determinación cuantitativa de las células vivas del hipocampo. Para ello, los cortes de cerebro fueron observados con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX51, Olympus Corporation, Japón) y el número de células neuronales vivas fueron cuantificadas usando el programa *Image J*.

Los datos son expresados como promedio de células vivas (\pm DE). El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el correspondiente análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0,05$).

4.6. Evaluación de la biodistribución de nanopartículas de rodamina en pulmón e hígado

Los órganos extraídos fueron pesados y homogenizados con volúmenes conocidos de diclorometano con el objetivo de romper las nanopartículas y extraer la rodamina (Rh). Después de 4 horas a temperatura ambiente, el extracto fue centrifugado a 4.500 rpm durante 10 minutos. La intensidad de fluorescencia de rodamina fue medida usando el espectrofotómetro Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, CA, EE.UU.) a una longitud de excitación de 351 nm y de emisión de 578 nm. Como control se utilizaron los órganos procedentes de animales no tratados. La cantidad de rodamina distribuida en los tejidos fue expresada como cantidad de rodamina por gramo de tejido. Dichas cantidades han sido normalizadas teniendo en cuenta la cantidad de rodamina administrada en cada formulación.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el correspondiente análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Características de las nanopartículas desarrolladas

Todas las formulaciones de nanopartículas (NP-1 a NP-6) cargadas y no cargadas con GAT han sido elaboradas por el método de nanoprecipitación (*Mundargi y col., 2008*). En este proceso, el polímero y el principio activo, se disuelve en acetona. Esta solución se adiciona sobre un no-solvente, una solución acuosa que contiene alcohol polivinílico (PVA), es decir, un disolvente que sea miscible con el disolvente del polímero y en el cual el polímero es insoluble. A medida que se adiciona el no-solvente se provoca la insolubilización del polímero, el cual precipita. El mecanismo de formación de las

partículas por este método se explica por las turbulencias interfaciales que se generan durante la sustitución del disolvente. Así, durante la preparación se produce una difusión violenta debida a la miscibilidad de los disolventes. Las gotículas de disolvente, de tamaño nanométrico, son eliminadas de la interfase (*Hans y col., 2002*). Estas gotículas se estabilizan rápidamente por el agente tensioactivo, hasta que se da la completa difusión del disolvente y, por tanto, la precipitación del polímero.

Tamaño y distribución de tamaños de nanopartículas de gatifloxacino

En la tabla 7.4 se muestran los valores medios de diámetro volumen así como los valores de índice de polidispersión y span correspondientes a las formulaciones NP-1 a NP-6.

Formulación	Diámetro medio (nm) \pm DE	Índice polidispersión	Span
NP-1	150,53 \pm 5,11	0,27	0,75
NP-2	176,56 \pm 11,63	0,36	1,03
NP-3	98,91 \pm 9,62	0,38	1,07
NP-4	176,50 \pm 2,90	0,30	0,82
NP-5	156,32 \pm 6,15	0,30	0,88
NP-6	182,93 \pm 2,54	0,29	0,85

Tabla 7.4. Diámetro medio, índice de polidispersión y span obtenidos para las NPs elaboradas. (Formulación NP-1 a NP-6).

En la figura 7.2 se recoge, a modo de ejemplo, una curva distributiva de cada una de las formulaciones indicadas previamente.

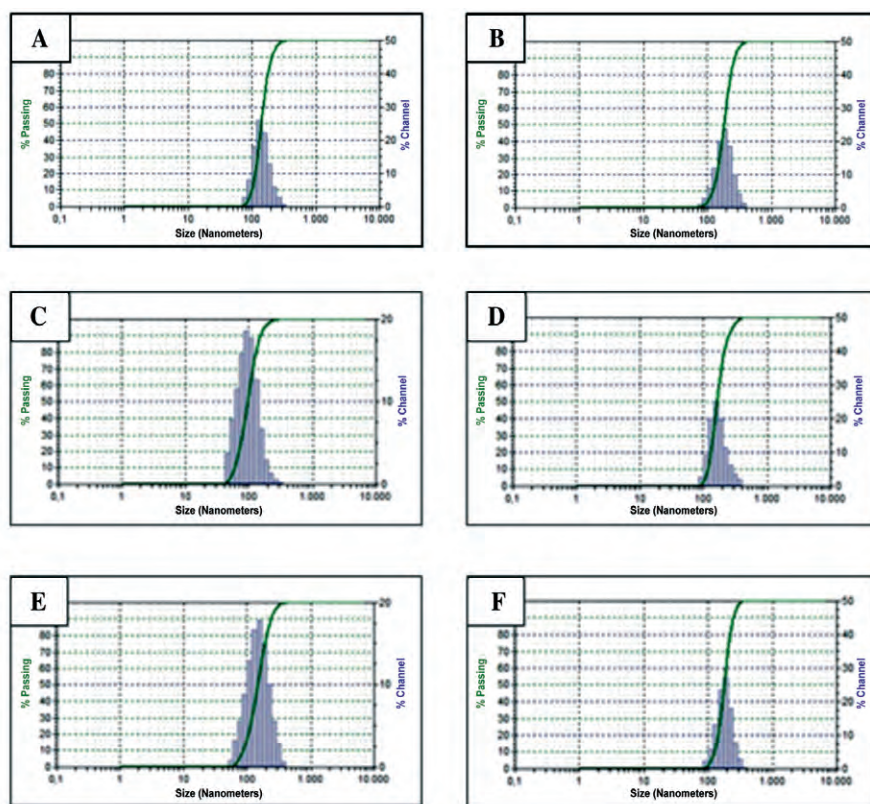


Figura 7.2. Distribución de tamaños obtenida para las NPs elaboradas: NP-1 (A), NP-2 (B), NP-3 (C), NP-4 (D), NP-5 (E) y NP-6 (F).

A partir de los resultados obtenidos, podemos indicar, que la presencia de polisorbato-80 en las formulaciones sin activo ($98,91 \pm 9,62 \mu\text{m}$) da lugar a una reducción significativa en el tamaño de partícula respecto a las nanopartículas no modificadas ($150,53 \pm 5,11$), lo que indica que la presencia de polisorbato es capaz de modificar las características morfológicas de la formulación. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores cuando incorporan polisorbato a diferentes formulaciones (*Yung-Chun y col., 2011; You y col., 2012; Kohei y col., 2010*). Sin embargo, en todas las formulaciones, la presencia de gatifloxacino implica un aumento significativo en el tamaño de partícula respecto a las formulaciones inertes.

Existen numerosos factores que condicionan el tamaño de partícula así, la concentración del polímero en el disolvente es un factor determinante. Gene-

ralmente se usan concentraciones entre el 1 y el 10% (p/v) de polímero. El aumento de la concentración del polímero es directamente proporcional al aumento del tamaño de las nanopartículas, debido al incremento en la viscosidad de la fase orgánica. Concentraciones altas de PVA (2-6% p/v), también se relacionan con una modificación en el tamaño de la formulación debido a un aumento en la viscosidad del medio acuoso que disminuye la velocidad de difusión del disolvente.

En nuestro caso, la adición de polisorbato 80 aumenta la viscosidad de la fase externa, lo que supone una clara disminución en el tamaño de las nanopartículas inertes. Este hecho, probablemente es debido a la modificación en la relación de la viscosidad entre el disolvente con el no-solvente. Además las nanopartículas han sido elaboradas por el método de nanoprecipitación, por tanto la velocidad de difusión de la acetona con el polímero disuelto será diferente en PVA que en la mezcla PVA con polisorbato 80.

Para todas las formulaciones (NP-1 a NP-6) los resultados de índice de polidispersión (PI) obtenido están comprendido entre 0,1-0,5 y los valores de span son inferiores a 1, lo que nos indica que el método empleado en la elaboración de las nanopartículas es adecuado para obtener distribuciones monodispersas. El peso molecular del agente estabilizante juega un papel importante para obtener una homogeneidad en el tamaño y una mejor redispersión de las partículas liofilizadas, así pues, la utilización de PVA de alto peso molecular da lugar a distribuciones más homogéneas.

Finalmente indicar que diferentes autores han afirmado que las nanopartículas modificadas con polisorbato 80 con tamaño medios del orden de 250 nm pueden atravesar la barrera hematoencefálica (*Kreuter y col., 2003; Alyautdin y col., 2001*). En nuestro caso todas las formulaciones con gatifloxacino presentan tamaños medios de partícula en torno a dicho valor, con distribuciones monodispersas y con poca variabilidad entre lotes. Estos tamaños son adecuados para el principal objetivo que es el paso de las NPs al sistema nervioso central a través de BHE.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En las figuras 7.3 a 7.8 se muestran las microfotografías obtenidas por SEM de las distintas nanopartículas elaboradas (NP-1 a NP-6).

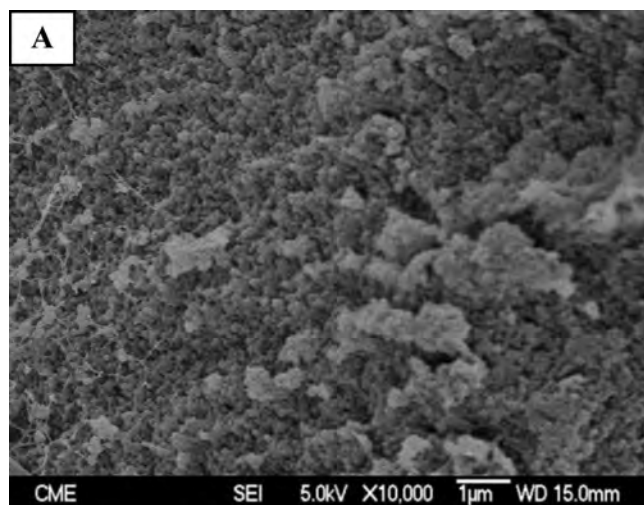


Figura 7.3. Microfotografía obtenida por SEM de las NPs blancas.
(Formulación NP-1).

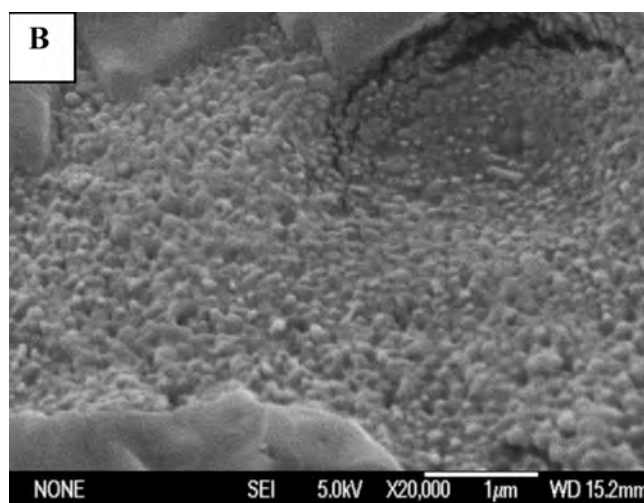


Figura 7.4. Microfotografía obtenida por SEM de las NPs cargadas
con GAT al 10%. (Formulación NP-2).

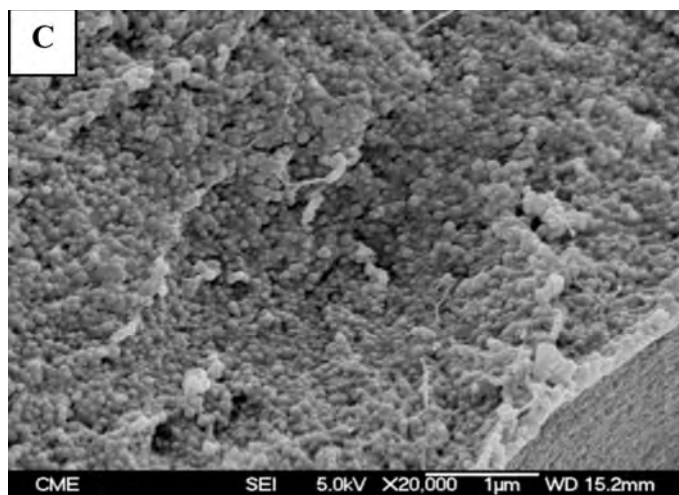


Figura 7.5. Microfotografía obtenida por SEM de las NPs blancas modificadas con polisorbato-80. (Formulación NP-3).

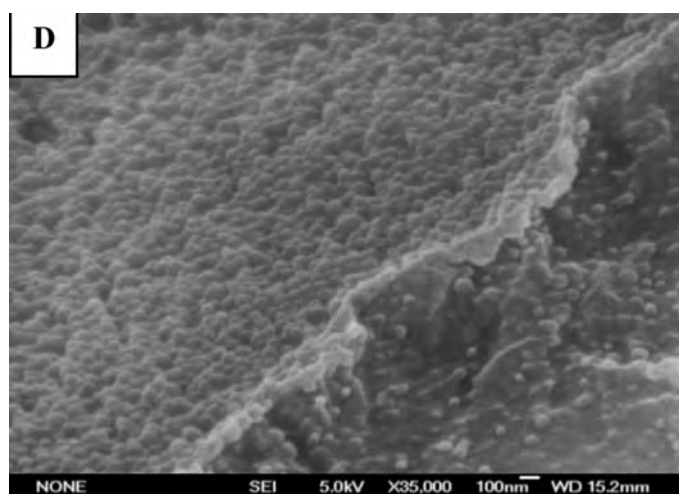


Figura 7.6. Microfotografía obtenida por SEM de las NPs cargadas con GAT y modificadas con polisorbato-80. (Formulación NP-4).

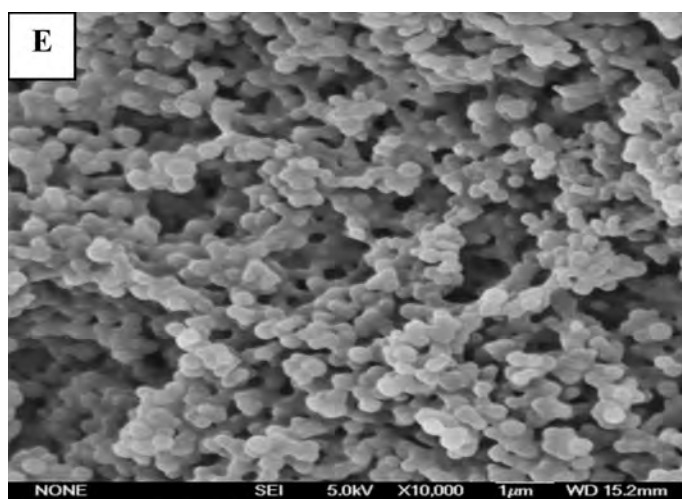


Figura 7.7. Microfotografía obtenida por SEM de las NPs blancas y modificadas con labrafil. (Formulación NP-5).

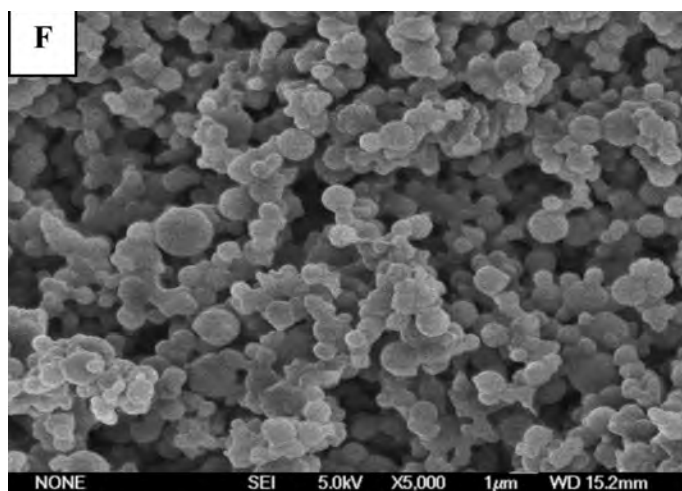


Figura 7.8. Microfotografía obtenida por SEM de las NPs cargadas con GAT modificadas con labrafil. (Formulación NP-6).

Los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido nos permite comprobar que, en todos los casos, las nanopartículas no modificadas son rígidas y esféricas, con independencia de que estén o no cargadas. No presentan cristales en el exterior, lo que indica que el principio activo se encuentra dentro de la matriz polimérica.

Las nanopartículas blancas modificadas con polisorbato-80 presentan también una superficie esférica sin embargo, se aprecia una mayor aglomeración en comparación con las no modificadas, esto probablemente es debido a la presencia del tensioactivo no iónico que crea una película en la superficie de las nanoesferas manteniéndolas unidas.

Las nanopartículas modificadas con labrafil presentan una superficie esférica, en estas formulaciones se observa una mayor agregación en comparación con las nanopartículas modificadas con polisorbato-80; esto puede ser debido a la presencia del labrafil en la superficie del nanosistema que favorece la agregación de las partículas manteniéndolas unidas.

5.2. Propiedad superficial: determinación del potencial ζ

En la tabla 7.5 se muestran los resultados de potencial ζ correspondientes a las formulaciones NP-1 a NP-6.

Formulación	Potencial ζ (mV) \pm DE
NP-1	$-23,0 \pm 1,34$
NP-2	$-18,6 \pm 0,42$
NP-3	$-19,1 \pm 1,10$
NP-4	$-20,1 \pm 1,1$
NP-5	$-17,3 \pm 1,0$
NP-6	$-19,3 \pm 0,8$

Tabla 7.5. Resultados obtenidos de potencial zeta para las NPs elaboradas. (Formulación NP-1 a NP-6).

En todas las formulaciones elaboradas el potencial ζ obtenido es negativo, esto probablemente se deba a la presencia de grupos carboxilos ionizados del PLGA en la superficie de las nanopartículas. El potencial ζ obtenido para la formulación NP-1 fue de $-23 \pm 1,3$ mV, similar al indicado en la bibliografía

para las nanopartículas preparadas con PLGA 502 (*Fonseca y col., 2002*), dicho valor asciende al funcionalizar las nanopartículas inertes con polisorbato 80 (potencial $\zeta = -19,1 \pm 1,10$ mV) o labrafil (potencial $\zeta = -17,3 \pm 1,0$ mV). Este hecho, probablemente, es debido a un cambio en la superficie de la nanopartícula por la presencia del surfactante en la formulación. Sin embargo, no observamos estas diferencias entre las formulaciones cargadas con gatifloxacino, obteniendo valores de potencial ζ muy similares en todas (NP-2, NP-4 y NP-6).

Diferentes autores han indicado que los nanosistemas con valores de potencial zeta positivos, aumentan su paso a través de BHE pero producen una respuesta inmune superior, activación del complemento, respecto a las nanopartículas con carga neutra o negativa (*Salvador-Morales y col., 2009*). Además, valores de potencial ζ entre -30 y 30 mV son adecuados para obtener suspensiones estables. A la vista de los resultados obtenidos podemos indicar que, probablemente, las formulaciones permanezcan un tiempo adecuado en el torrente sanguíneo para poder atravesar la BHE.

5.3. Rendimiento del proceso de elaboración y eficacia de encapsulación

En la tabla 7.6 se recogen los datos obtenidos para el rendimiento del proceso de elaboración de las formulaciones desarrolladas (NP-1 a NP-6).

Formulación	Rendimiento medio del proceso (%) \pm DE
NP-1	66,13 \pm 2,10
NP-2	53,78 \pm 4,30
NP-3	44,68 \pm 1,38
NP-4	43,97 \pm 2,07
NP-5	49,12 \pm 4,40
NP-6	43,09 \pm 4,50

Tabla 7.6. Rendimiento medio del proceso de elaboración obtenido para las NPs elaboradas. (Formulación NP-1 a NP-6).

El rendimiento medio del proceso de elaboración para las formulaciones no funcionalizadas (NP-1 y NP-2) resultó ser de $66,13 \pm 2,10\%$ y $53,78 \pm 4,30\%$, respectivamente. Valores significativamente superiores a los obtenidos para las formulaciones funcionalizadas tanto cargadas como no cargadas con gatifloxacino. Para las nanopartículas no cargadas y funcionalizadas con polisorbato 80 (NP-3) o labrafil (NP-5) el rendimiento medio del proceso de elaboración fue $44,68 \pm 1,38\%$ y $49,12 \pm 4,40\%$, respectivamente. Las nanopartículas que contiene gatifloxacino y funcionalizadas con polisorbato 80 (NP-4) o labrafil (NP-6) presentan rendimiento del proceso de elaboración de $43,97 \pm 2,07\%$ y $43,09 \pm 4,50\%$, valores similares a los obtenidos cuando se preparan nanopartículas funcionalizadas no cargadas.

En la tabla 7.7 se muestran los resultados de eficacia de encapsulación de las formulaciones cargadas con gatifloxacino (NP-2, NP-4 y NP-6). En el cálculo de la eficacia de encapsulación (EE%) de las formulaciones modificadas con polisorbato y con labrafil, se ha determinado la cantidad teórica de cada uno de los excipientes presente en la formulación, tal y cómo se ha descrito en el apartado de materiales y métodos de esta memoria experimental.

Formulación	Cantidad encapsulada media (μg)/100 mg de NPs \pm DE	EE media (%) \pm DE
NP-2	$1543,92 \pm 1,56$	$34,14 \pm 0,12$
NP-4	$842,74 \pm 2,46$	$28,24 \pm 0,23$
NP-6	$404,83 \pm 2,98$	$10,37 \pm 1,09$

Tabla 7.7. Cantidad encapsulada media y eficacia de encapsulación media de GAT obtenida para las NPs elaboradas. (Formulación NP-2, NP-4 y NP-6).

La eficacia de encapsulación media para todas las formulaciones resultó ser baja, inferior al 40%. Los valores de eficacia de encapsulación disminuyen cuando las nanopartículas se funcionalizan con polisorbato 80 ($28,24 \pm 0,23\%$) o con labrafil ($10,37 \pm 1,09\%$). Esta disminución se debe, probablemente, a la

presencia de parte del agente tensioactivo en la fase acuosa, lo que favorece el paso del activo a la misma y, por tanto, dificultando la encapsulación del mismo.

5.4. Ensayo de cesión

En las tablas 7.8 a 7.10 se recogen los resultados obtenidos en los estudios de cesión de las distintas formulaciones cargadas con gatifloxacino (NP-2, NP-4 y NP-6).

Tiempo (h)	Cantidad cedida acumulada media (μg) \pm DE	% Cedido acumulado medio \pm DE
1	504,95 \pm 50,85	32,85 \pm 0,64
3	900,90 \pm 110,23	58,56 \pm 2,41
6	1.144,62 \pm 140,27	74,41 \pm 3,08
8	1.290,56 \pm 142,45	83,93 \pm 2,45
24	1.458,37 \pm 119,11	94,96 \pm 0,03
48	1.535,75 \pm 124,95	96,53 \pm 0,02

Tabla 7.8. Cantidades (\pm DE) y porcentajes medios cedidos acumulados (\pm DE) de GAT correspondientes a la formulación NP-2.

Tiempo (h)	Cantidad cedida acumulada media (μg) \pm DE	% Cedido acumulado medio \pm DE
1	307,93 \pm 28,96	36,53 \pm 3,15
3	537,22 \pm 41,86	63,74 \pm 311,64
6	695,03 \pm 11,71	82,48 \pm 0,75
8	723,32 \pm 61,79	85,81 \pm 6,67
24	823,86 \pm 17,16	97,76 \pm 1,28
48	842,66 \pm 6,56	97,86 \pm 1,07

Tabla 7.9. Cantidades (\pm DE) y porcentajes medios cedidos acumulados (\pm DE) de GAT correspondientes a la formulación NP-4.

Tiempo (h)	Cantidad cedida acumulada media (μg) \pm DE	% Cedido acumulado medio \pm DE
1	149,20 \pm 9,13	36,94 \pm 1,61
3	259,83 \pm 27,40	64,18 \pm 0,06
6	340,83 \pm 20,20	84,39 \pm 3,83
8	351,41 \pm 55,32	86,56 \pm 4,61
24	395,47 \pm 42,68	97,67 \pm 0,33
48	404,82 \pm 42,31	98,17 \pm 0,21

Tabla 7.10. Cantidades (\pm DE) y porcentajes medios cedidos acumulados (\pm DE) de GAT correspondientes a la formulación NP-6.

En las figuras 7.9 a 7.11 se muestran los perfiles de cesión medios de las formulaciones NP-2, NP-4 y NP-6.

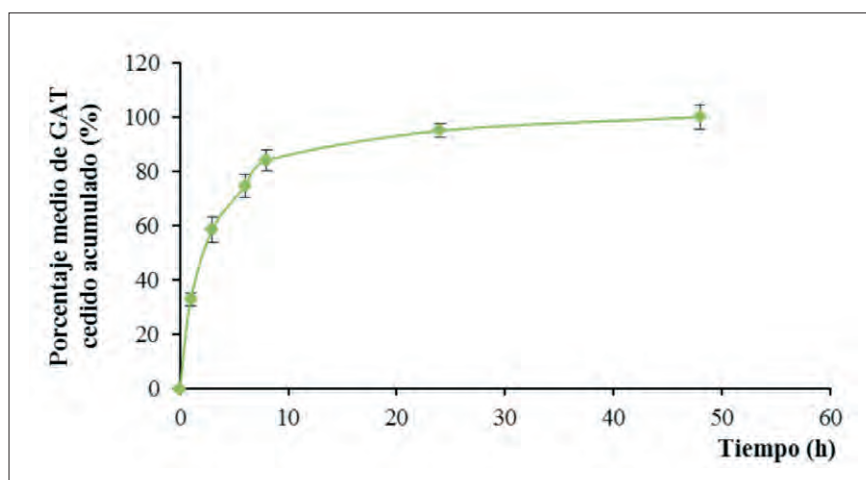


Figura 7.9. Porcentajes medios cedidos acumulados de GAT correspondientes a la formulación NP-2.

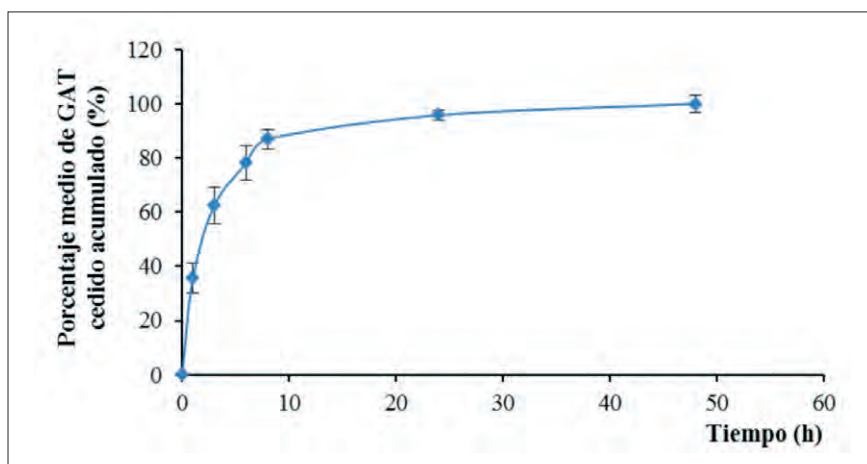


Figura 7.10. Porcentajes medios cedidos acumulados de GAT correspondientes a la formulación NP-4.

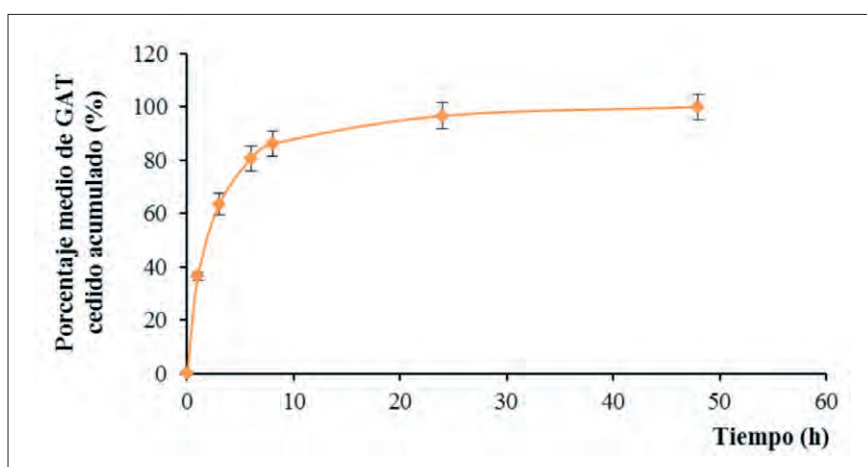


Figura 7.11. Porcentajes medios cedidos acumulados de GAT correspondientes a la formulación NP-6.

En todas las formulaciones elaboradas se observa un perfil de cesión bifásico con una liberación rápida durante las diez primeras horas, seguido de una cesión más lenta que dura aproximadamente 50 horas. En todos los casos el porcentaje cedido a las 24 horas fue superior al 90%. Esta rápida liberación de GAT es debido, fundamentalmente, a las características físico-químicas del gatifloxacino, que tiene una mayor afinidad por el tampón fosfato que por la matriz

polimérica. Además, el tamaño nanométrico de estos sistema da lugar a una mayor relación área superficial-volumen, lo que favorece una liberación muy rápida del principio activo al medio (*Bawarski y col., 2008; Lu y col., 2014*).

La rápida cesión del principio activo nos proporciona un bajo control temporal de la liberación del mismo, sin embargo, es necesario indicar que buscamos la vectorización del principio activo en el lugar de acción, es decir, un control espacial del sistema para que pueda acceder al cerebro y 10 horas de liberación resultan adecuadas para nuestros objetivos.

5.5. Evaluación *in vivo* del paso de nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica

Para realizar los estudios *in vivo* de paso a través de barrera, se preparan diferentes formulaciones de PLGA funcionalizadas con polisorbato 80 y con labrafil, incluyendo una sustancia fluorescente (Rodamina 123) que pueda ser observada al microscopio en los cortes de cerebro.

Caracterización de la formulación

En la tabla 7.11 se recogen los valores de tamaño medios (\pm DE) de partícula, índice de polidispersión y span correspondientes a las formulaciones que incluyen rodamina.

Formulación	Diámetro medio (nm) \pm DE	Índice polidispersión	Span
NPR-1	234,83 \pm 4,30	0,41	0,89
NPR-2	194,90 \pm 5,67	0,29	0,79
NPR-3	267,76 \pm 11,01	0,35	0,81

Tabla 7.11. Diámetro medio, índice de polidispersión y span obtenidos para las NPs cargadas con rodamina. (Formulación NPR-1, NPR-2 y NPR-3).

En la figura 7.12 se muestra, a modo de ejemplo, la distribución de tamaños obtenida para las tres formulaciones.

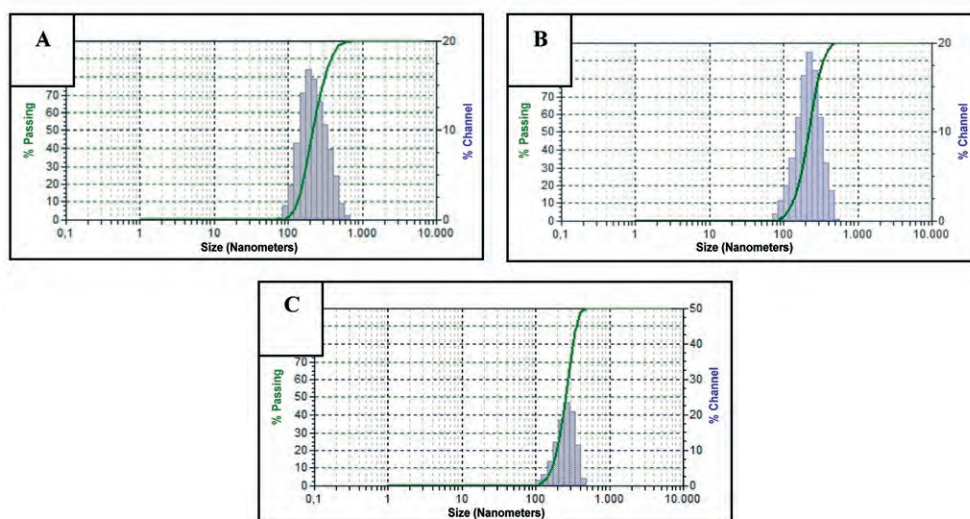


Figura 7.12. Distribución de tamaños obtenida para las NPs cargadas con rodamina: NPR-1(A), NPR-2 (B) y NPR-3 (C).

Los resultados obtenidos muestran, en todos los casos, que la adición de rodamina en las formulaciones, aumenta de forma significativa el tamaño de partícula. Además, al igual que ocurría en las formulaciones funcionalizadas con polisorbato 80 pero sin principio activo, la presencia de dicho agente tensoactivo provoca una disminución significativa en el diámetro medio de las partículas.

Las figuras 7.13 a 7.15 muestran las microfotografías correspondientes a las nanopartículas cargadas con rodamina (NPR-1), nanopartículas cargadas con rodamina y modificadas con polisorbato 80 (NPR-2) y nanopartículas cargadas con rodamina y modificadas con labrafil (NPR-3).

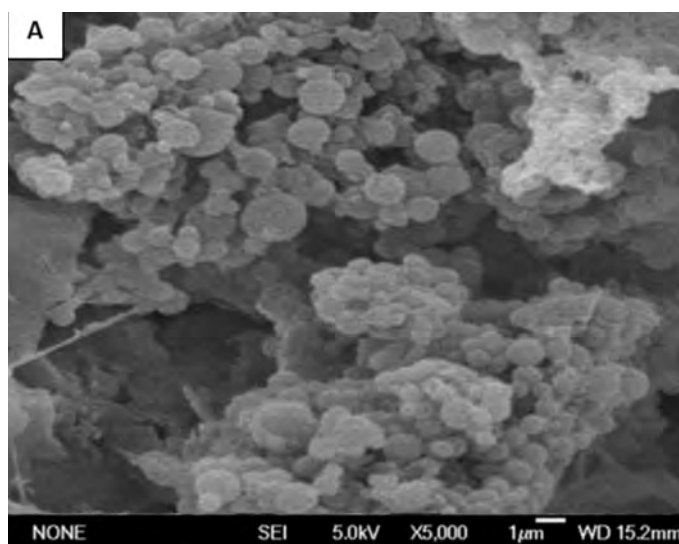


Figura 7.13. Microfotografía obtenida por SEM de NPs cargadas con Rh. (Formulación NPR-1).

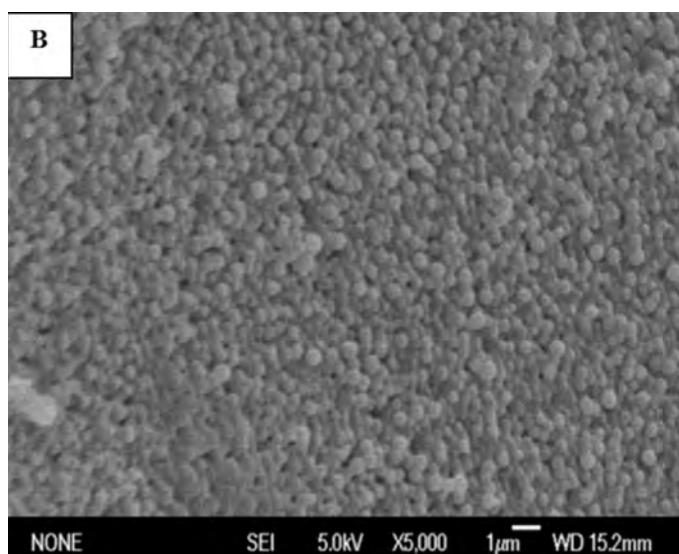


Figura 7.14. Microfotografía obtenida por SEM de NPs cargadas con Rh y recubiertas con polisorbato 80. (Formulación NPR-2).

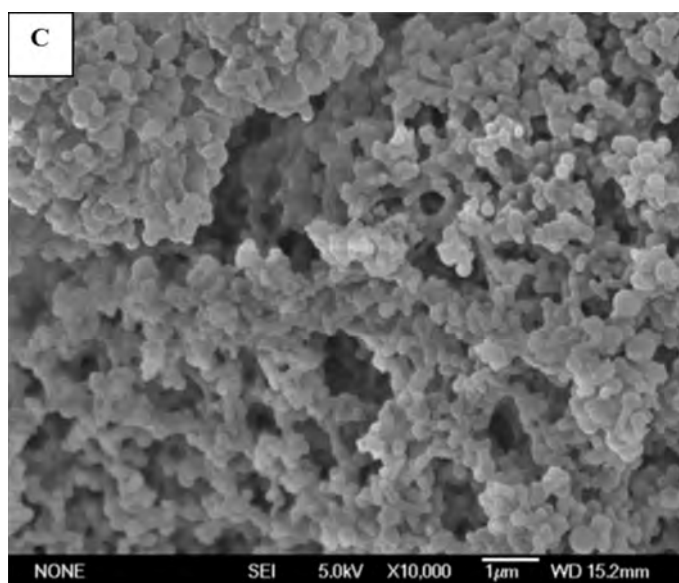


Figura 7.15. Microfotografía obtenida por SEM de NPs cargadas con Rh y recubiertas con labrafil. (Formulación NPR-3).

Los resultados de SEM muestran que las nanopartículas preparadas con rodamina (NPR-1, NPR-2 y NPR-3) presentan una forma esférica con superficie rígida. Además, no se observa la presencia de cristales en el exterior, lo que indica que el agente fluorescente se encuentra encapsulado en la matriz polimérica. Al igual que ocurre en las formulaciones cargadas con GAT, las nanopartículas elaboradas con labrafil y cargadas con rodamina, presentan mayor agregación que las nanopartículas no funcionalizadas (NPR-1) y las modificadas con polisorbato 80 (NPR-2), probablemente debido a la disposición del labrafil en la superficie de la matriz polimérica.

En la tabla 7.12 se muestran los resultados del rendimiento medio del proceso de elaboración, cantidad media encapsulada y eficacia de encapsulación media para las tres formulaciones cargadas con rodamina.

Formulación	Rdto medio (%) \pm DE	Cantidad encapsulada (mg)/100 mg de NPs \pm DE	EE media (%) \pm DE
NPR-1	49,50 \pm 5,40	2,63 \pm 0,04	55,31 \pm 0,44
NPR-2	48,01 \pm 3,28	2,44 \pm 0,20	51,31 \pm 0,28
NPR-3	43,67 \pm 2,47	2,72 \pm 0,02	60,90 \pm 0,38

Tabla 7.12. Rendimiento medio del proceso de elaboración, cantidad encapsulada y eficacia de encapsulación media obtenida para las formulaciones NPR-1, NPR-2 y NPR-3.

El rendimiento medio del proceso de elaboración para las formulaciones con rodamina fue superior al 40%. Los valores de eficacia de encapsulación fue, en todos los casos, superior al 50%, con valores de 55,31 \pm 0,44%, 51,31 \pm 0,28% y 60,90 \pm 0,38% para las formulaciones NPR-1, NPR-2 y NPR-3, respectivamente. Los valores obtenidos de cantidad de rodamina encapsulada fueron elevados oscilando entre 2,42 mg/100 mg de NP y 2,7 mg/100 mg de NPs, probablemente debido al carácter apolar de la rodamina.

Estudios in vivo

Los estudios se llevaron a cabo en ratas Wistar a las que se le administró, a través de la vena de la cola, las diferentes formulaciones de nanopartículas suspendidas en suero salino: nanopartículas de rodamina no funcionalizadas (NPR-1), nanopartículas de rodamina recubiertas con polisorbato 80 (NPR-2), y nanopartículas de rodamina funcionalizadas con labrafil (NPR-3). Las ratas se sacrificaron a los siguientes tiempos: 30 y 60 minutos.

Como control, se administró una solución de rodamina en suero salino, (0,5 mg/kg de peso) con el fin de comprobar que la fluorescencia obtenida en el cerebro se debe al paso de las formulaciones y no a la rodamina liberada previamente a partir de estos sistemas. Con el fin de evaluar la posible auto-

fluorescencia de las muestras obtenidas, se analizaron cortes cerebrales de animales no tratados a los dos tiempos de estudio: 30 y 60 min.

En las figuras 7.16 a 7.31 se recogen las microfotografías obtenidas de cortes cerebrales pertenecientes al hipocampo y corteza cerebral para las formulaciones ensayadas a los dos tiempos establecidos.

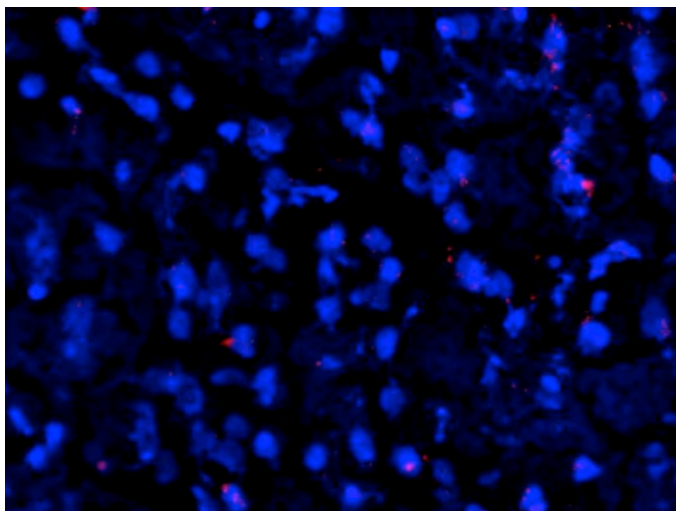


Figura 7.16. *Microfotografía de corteza obtenida a los 30 min de la administración de una solución de Rh en suero salino.*

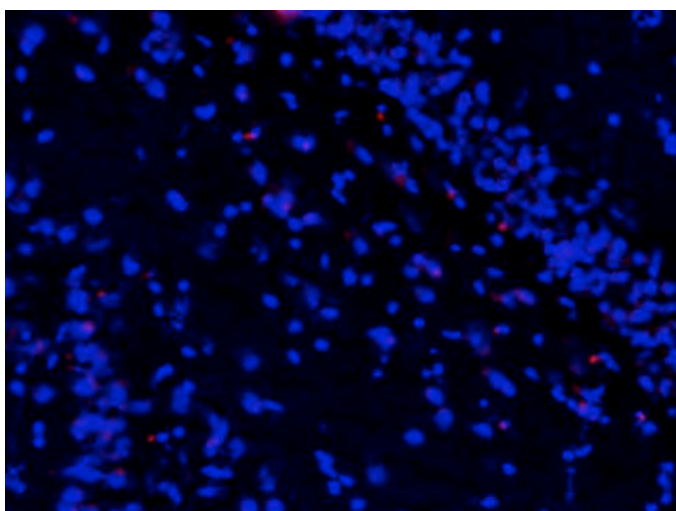


Figura 7.17. *Microfotografía de hipocampo obtenida a los 30 min de la administración de una solución de Rh en suero salino.*

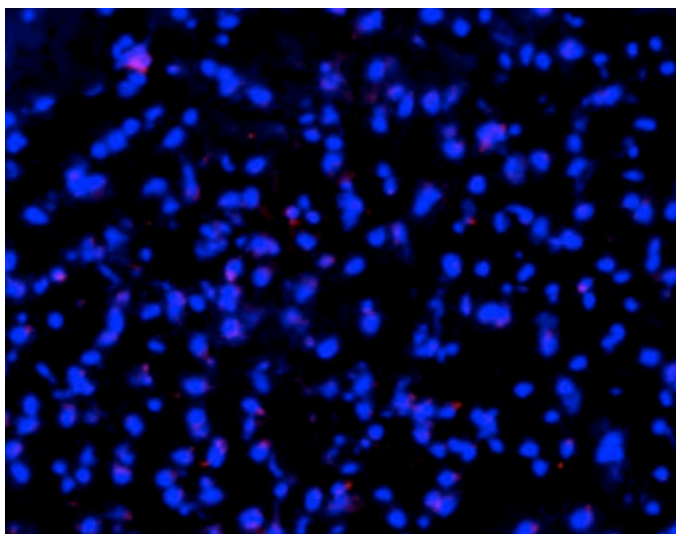


Figura 7.18. Microfotografía de corteza obtenida a los 30 min de la administración de la formulación NPR-1 suspendida en suero salino.

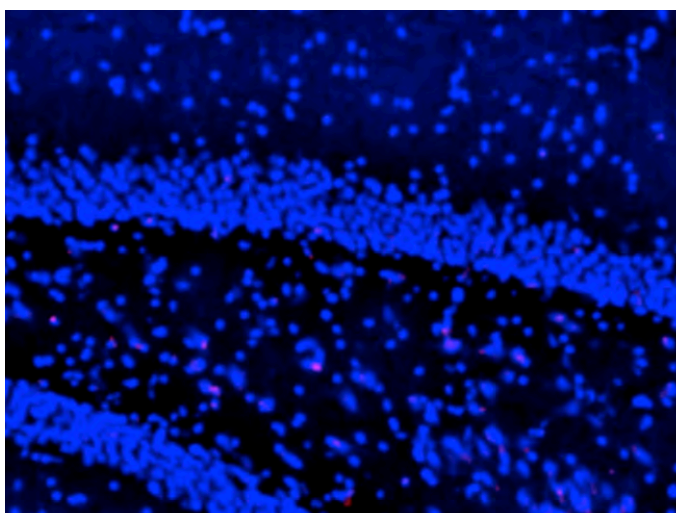


Figura 7.19. Microfotografía de hipocampo obtenida a los 30 min de la administración de la formulación NPR-1 suspendida en suero salino.

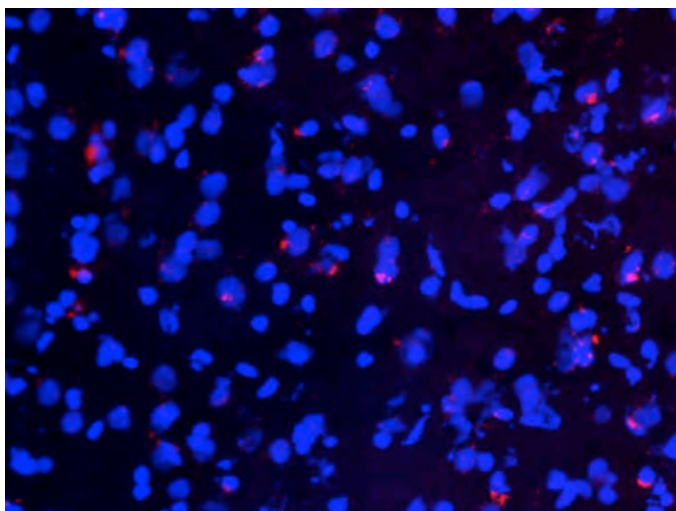


Figura 7.20. Microfotografía de corteza obtenida a los 30 min de la administración de la formulación NPR-2 suspendida en suero salino.

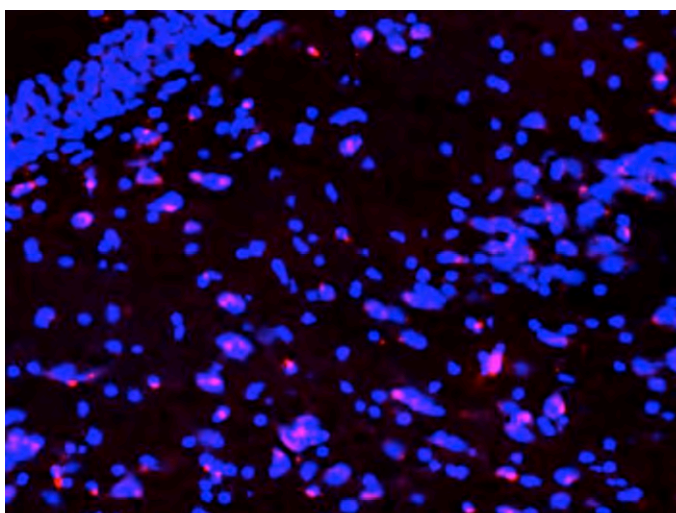


Figura 7.21. Microfotografía de hipocampo obtenida a los 30 min de la administración de la formulación NPR-2 suspendida en suero salino.

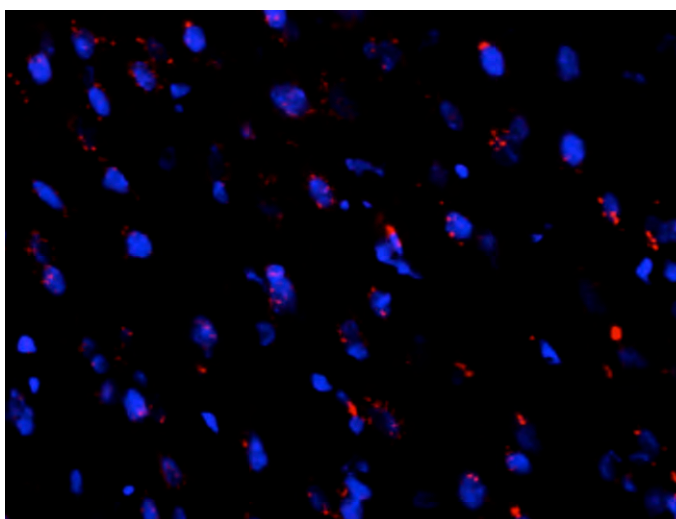


Figura 7.22. Microfotografía de corteza obtenida a los 30 min de la administración de la formulación NPR-3 suspendida en suero salino.

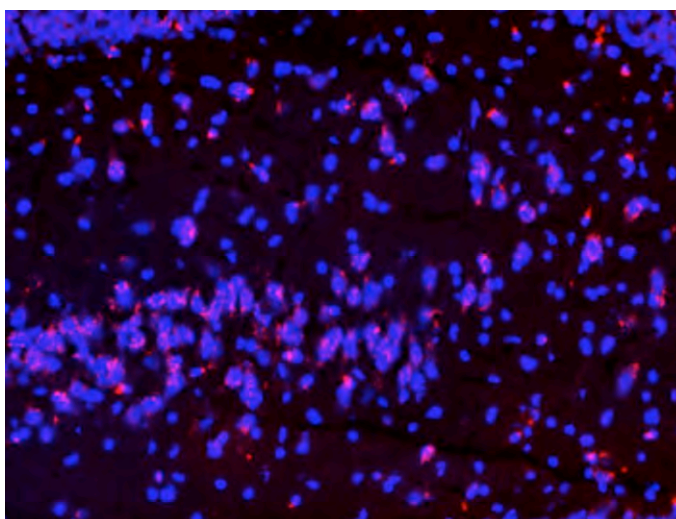


Figura 7.23. Microfotografía de hipocampo obtenida a los 30 min de la administración de la formulación NPR-3 suspendida en suero salino.

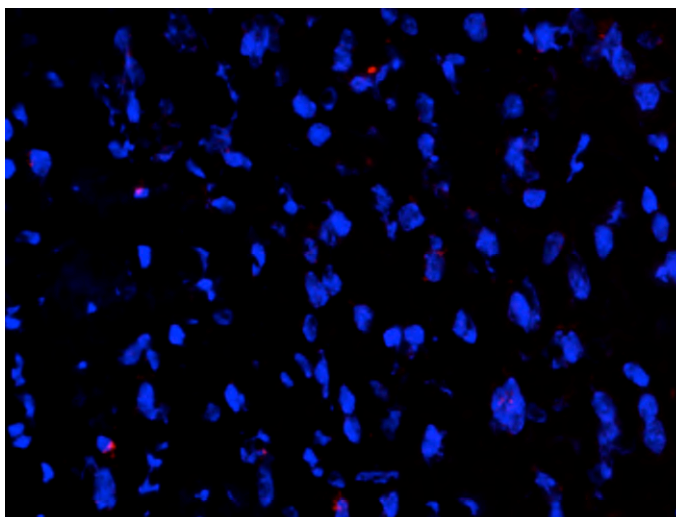


Figura 7.24. Microfotografía de corteza obtenida a los 60 min de la administración de Rh disuelta en suero salino.

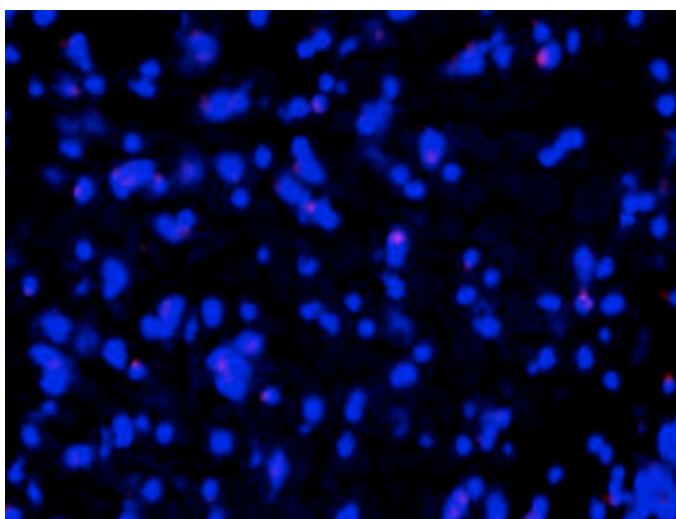


Figura 7.25. Microfotografía de hipocampo obtenida a los 60 min de la administración de Rh disuelta en suero salino.

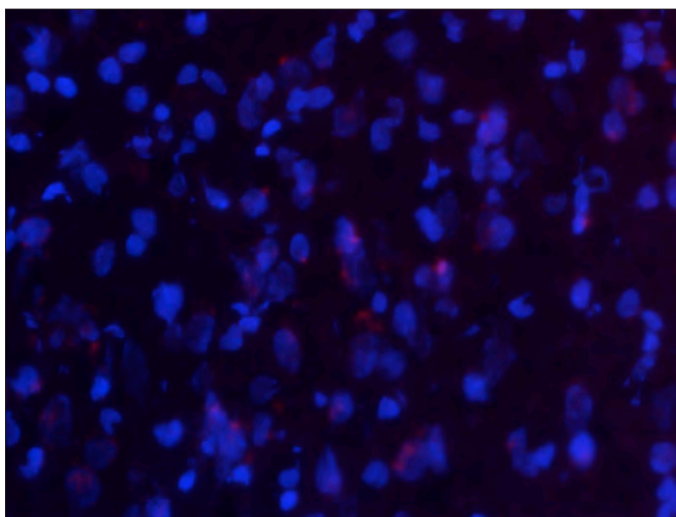


Figura 7.26. Microfotografía de corteza obtenida a los 60 min de la administración de la formulación NPR-1 suspendida en suero salino.

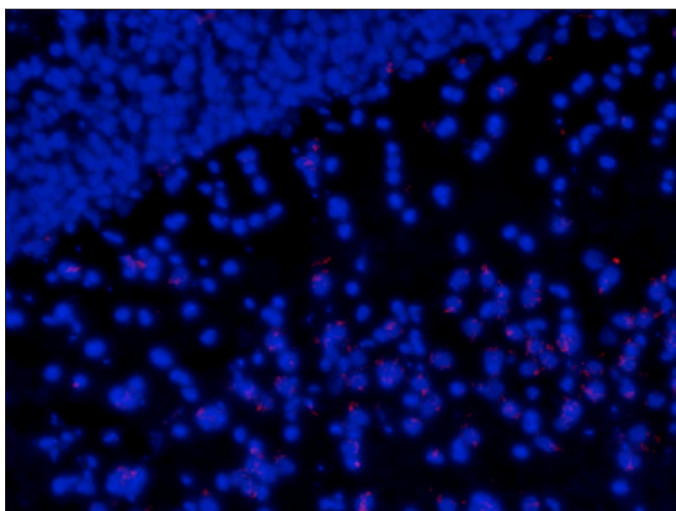


Figura 7.27. Microfotografía de hipocampo obtenida a los 60 min de la administración de la formulación NPR-1 suspendida en suero salino.

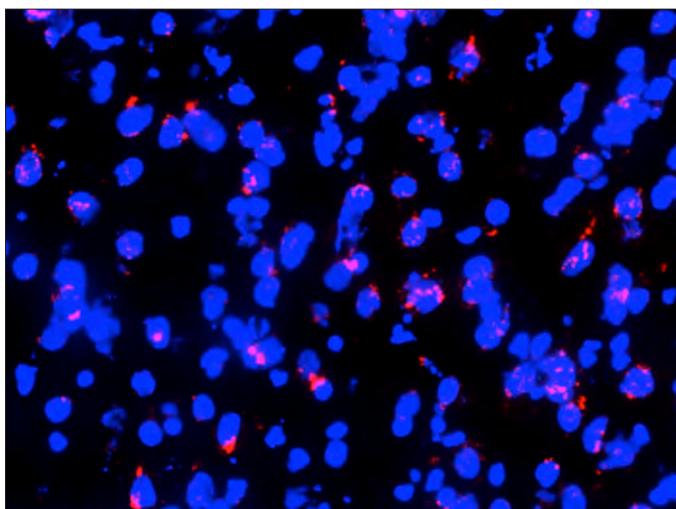


Figura 7.28. Microfotografía de corteza obtenida a los 60 min de la administración de la formulación NPR-2 suspendida en suero salino.

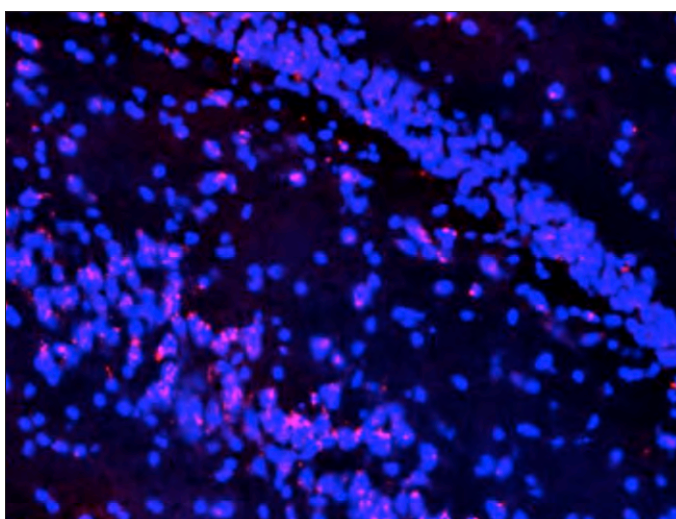


Figura 7.29. Microfotografía de hipocampo obtenida a los 60 min de la administración de la formulación NPR-2 suspendida en suero salino.

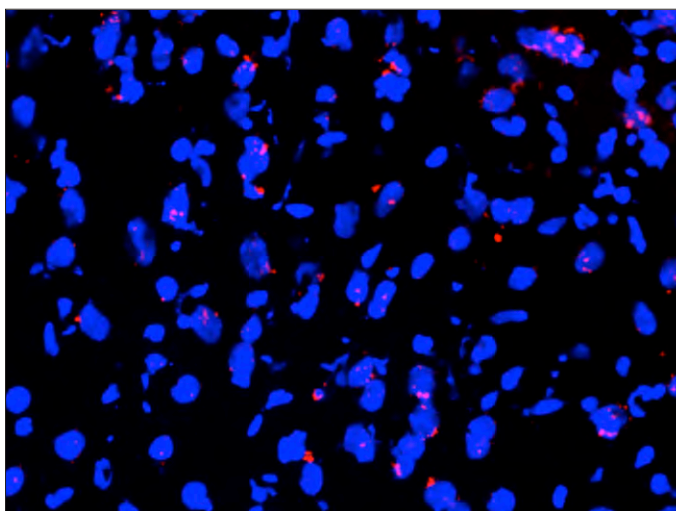


Figura 7.30. Microfotografía de corteza obtenida a los 60 min de la administración de la formulación NPR-3 suspendida en suero salino.

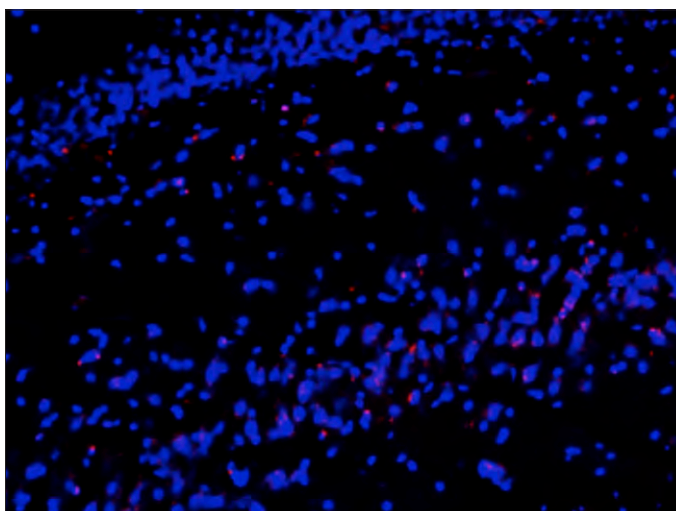


Figura 7.31. Microfotografía de hipocampo obtenida a los 60 min de la administración de la formulación NPR-3 suspendida en suero salino.

Como ya se ha indicado anteriormente, el DAPI es un agente fluorescente que se excita a 358 nm produciendo una fluorescencia azul cuando se encuentra unido al ADN. Esta tinción nos permite diferenciar los núcleos de las células neuronales. La rodamina es un colorante que se une a las membranas mito-

condriales, este compuesto podemos distinguirlo a partir de la fluorescencia de color rojo presente en la diferentes microfotografías.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que, en las muestras correspondientes a la solución de rodamina 123 en suero salino, obtenemos una ligera fluorescencia en las estructuras cerebrales analizadas a los dos tiempos ensayados, lo que nos indica que una pequeña parte de la rodamina es capaz de atravesar la BHE. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores que han utilizado este compuesto para realizar estudios *in vivo* de paso a través de BHE, debido a su baja capacidad de atravesar la BHE (Martins y col., 2012; Tahara y col., 2011; Tosi y col., 2010).

Cuando analizamos la formulación de NPs cargadas con rodamina con la superficie sin modificar (NPR-1), observamos un ligero incremento en la fluorescencia en corteza, en relación a cuando se emplea la rodamina en solución. Este hecho se produce a los dos tiempos. Cuando comparamos los resultados a ambos tiempos, podemos observar una menor fluorescencia a los 60 min que a los 30 min, tanto en corteza como hipocampo. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores cuando administran nanopartículas de PLGA de tamaños inferiores a 250 nm, lo que indican que estos sistemas son capaces de atravesar la BHE y llegar al parénquima cerebral (Kreuter y col., 2003; Alyautdin y col., 2001). Sin embargo, esta formulación (NPR-1) muestra una menor fluorescencia que las formulaciones que poseen la superficie modificada con los surfactantes seleccionados (NPR-2 y NPR-3).

Cuando se analizan los cortes de cerebro correspondientes a las nanopartículas recubiertas con polisorbato 80 (NPR-2) se observa a los 60 min, tanto en corteza como en hipocampo, un incremento en la fluorescencia respecto las NPs no funcionalizadas. Muchos autores han obtenido un incremento en el paso a través de la BBB cuando las NPs se recubren con polisorbato. La mayoría de los autores sostienen que el paso a través de la BHE de las NPs recubiertas con polisorbato 80 (NPR-2), se debe a que las apolipoproteínas A y E del plasma se adhieren a la superficie del sistema. Así, cuando las nanopartículas llegan

a la BHE son reconocidas por los receptores de la proteína de baja densidad (LDL), expresados en la superficie de las células endoteliales, permitiendo su paso al sistema nervioso central (*Rocha S., 20013; Kreuter y col., 2006*).

Los cortes cerebrales de hipocampo correspondientes a las nanopartículas modificar con labrafil (NPR-3) presentan una mayor fluorescencia a los 30 min en comparación con las nanopartículas sin modificar (NPR-1). Dicho incremento se mantiene a los 60 min. Resultados similares se observan para la formulación NPR-2, lo que nos indica que con ambas formulaciones se incrementa el paso a través de barrera.

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la rodamina en cerebro

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia en los cortes cerebral mediante el programa *imagen J*, nos permiten llevar a cabo una comparación entre las distintas formulaciones.

En las tablas 7.13 y 7.14 se recogen resultados de intensidad de fluorescencia de los cortes histológicos en corteza e hipocampo de las formulaciones ensayadas a los 30 min y 60 minutos, respectivamente. En las figuras 7.32 y 7.33 se muestran las representaciones gráficas de dichos resultados.

Formulación	Intensidad de fluorescencia media \pm DE	
	Hipocampo	Corteza
Rodamina	13.777 \pm 1.387	10.775 \pm 1.119
NPR-1	19.954 \pm 1.685	16.986 \pm 3.485
NPR-2	29.717 \pm 1.053	17.569 \pm 3.424
NPR-3	29.610 \pm 2.455	18.088 \pm 2.109

Tabla 7.13. Resultados de intensidad de fluorescencia en hipocampo y corteza obtenidos para las formulaciones de Rh a los 30 min.

Formulación a 60 min	Intensidad de fluorescencia media \pm DE	
	Hipocampo	Corteza
Rodamina	9.789 ± 1.569	3.129 ± 1.530
NPR-1	10.315 ± 1.827	9.222 ± 2.049
NPR-2	30.258 ± 2.127	31.356 ± 1.951
NPR-3	21.350 ± 1.713	26.253 ± 2.835

Tabla 7.14. Resultados de intensidad de fluorescencia en hipocampo y corteza obtenidos para las formulaciones de Rh a los 60 min.

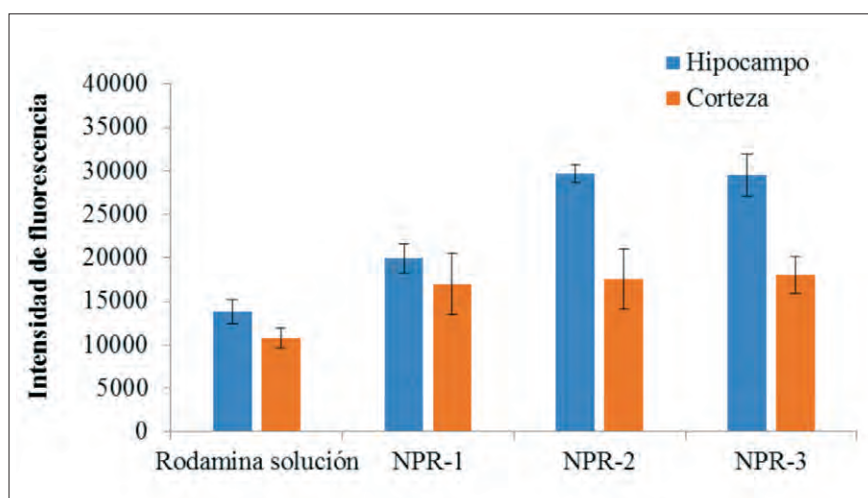


Figura 7.32. Resultados de intensidad de Rh en hipocampo y corteza obtenidos para las formulaciones de rodamina a los 30 min.

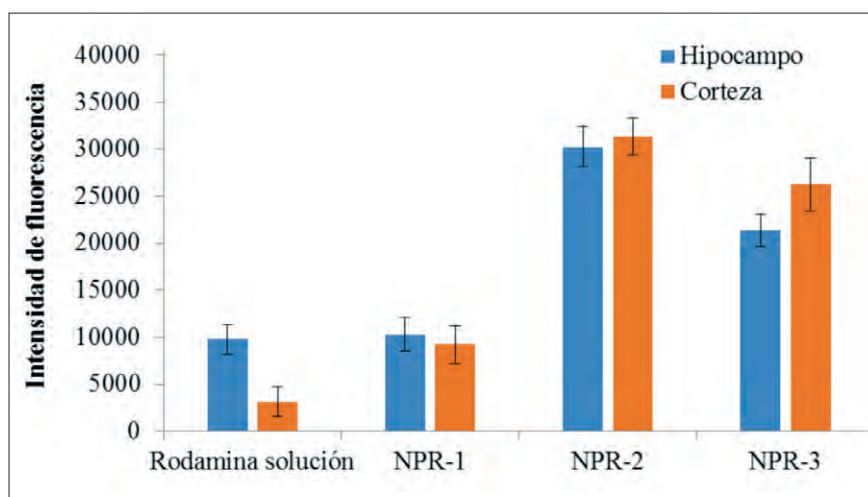


Figura 7.33. Resultados de intensidad de Rh en hipocampo y corteza obtenidos para las formulaciones de rodamina a los 60 min.

Cuando se cuantifica la intensidad de la fluorescencia en hipocampo se observa que a los 30 min, los valores más altos se obtienen después de la administración de las nanopartículas modificadas (NPR-2 y NPR-3). La intensidad de fluorescencia en hipocampo obtenidas después de la administración de NPs de rodamina no modificadas (NPR-1), resulta claramente inferior al obtenido con las formulaciones funcionalizadas (NPR-2 y NPR-3). Los valores más bajos de fluorescencia, como cabe esperar, se corresponden con la rodamina administrada en solución. Por otro lado, a este tiempo, se observa que las intensidades de fluorescencia son marcadamente superiores en hipocampo que en corteza para las dos formulaciones modificadas superficialmente (NPR-2 y NPR-3).

Para las formulaciones no funcionalizadas (solución rodamina y NPR-1), los valores de intensidad de fluorescencia disminuyen a los 60 minutos, en comparación a los 30 minutos. Dicha disminución resultó significativa para la solución de rodamina. Además, dicha reducción fue más acusada en la corteza, donde se obtuvieron reducciones superiores al 60%. Este descenso en la fluorescencia podría ser debido a que la rodamina 123 es sustrato de la glicoproteína p, sistema de eflujo, localizado en la barrera hematoencefálica que expulsa la rodamina hacia el exterior.

Los valores más elevados de intensidad de fluorescencia en los cortes cerebrales a los 60 minutos se obtienen con las nanopartículas funcionalizadas (NPR-2 y NPR-3). A este tiempo las diferencias entre las formulaciones funcionalizadas (NPR-2 y NPR-3) y las no funcionalizada (NPR-1) se hacen más evidentes. Así, la intensidad de fluorescencia obtenida en hipocampo para la formulación NPR-2 es aproximadamente tres veces superior a la obtenida para la formulación NPR-1. En corteza cerebral, la intensidad de fluorescencia fue tres veces superior para las dos formulaciones funcionalizadas (NPR-2 y NPR-3) respecto a las NPs no funcionalizadas (NPR-1).

Por tanto, a la vista de los resultados indicados previamente podemos decir, que a los dos tiempos ensayados se observa que las nanopartículas sin recubrir (NPR-1) dan lugar a una menor intensidad de fluorescencia que las NPs modificadas. Si tenemos en cuenta que la rodamina es eliminada del cerebro por los mecanismos de eflujo, el incremento en la fluorescencia en hipocampo y corteza, solo puede ser explicado por el aumento de paso de las nanopartículas funcionalizadas al SNC que están liberando la rodamina una vez el sistema ha atravesado la BHE.

Las marcadas diferencias encontradas a nivel de corteza a los 60 minutos con las partículas funcionalizadas prodría explicarse por una saturación de la glicoproteína-p, que es la responsable de la salida de la rodamina. Este hecho solo puede ser explicado por un mayor paso de las nanopartículas.

De los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de la fluorescencia, podemos indicar que la modificación superficial del sistema polimérico tanto con polisorbato 80 como con labrafil facilita el acceso de las NPs al SNC a través de la barrera hematoencefálica.

Estudio de neurotoxicidad

En la actualidad, una de las estrategias más prometedoras para mejorar el tratamiento de enfermedades cerebrales, como la tuberculosis cerebral,

son las nanopartículas poliméricas. Los polímeros usados para estos sistemas incluyen materiales naturales y/o sintéticos biodegradables y biocompatibles, no tóxicos, no trombogénicos, no inmunogénicos. En general, los polímeros ofrecen algunas ventajas sobre las moléculas naturales (albúmina, gelatina, alginato, colágeno y quitosano) porque pueden ser más fácilmente modificados. Por otro lado, los polímeros naturales presentan una elevada variabilidad entre los lotes debido a los diferentes procesos de purificación, y a los procedimientos de reticulación (*Hans y Lowman, 2002*). En este sentido, el poliláctico-co-glicólico (PLGA), está aprobado por la FDA para la elaboración de nanopartículas para uso humano; la degradación en ácido láctico y ácido glicólico (sustratos del ciclo de Krebs) se produce por una escisión autocatalítica de los enlaces éster a través de hidrólisis espontánea (*Li, 1999*).

A pesar de la inocuidad de los materiales utilizados para la elaboración de las formulaciones desarrolladas, es importante considerar los posibles efectos tóxicos de estos sistemas. El pequeño tamaño de las nanopartículas aumenta su reactividad e influye en sus propiedades físico-químicas y su interacción con el medio. De hecho, los sistemas con tamaños nanométricos presentan una mayor relación superficie/volumen, lo que condiciona su reactividad y ciertas propiedades físico-químicas. Por ejemplo, las partículas pequeñas poseen puntos de fusión más bajo debido a ese aumento de la superficie específica (*Sun y Simon, 2007*).

En la actualidad, se están desarrollando estudios con el objetivo de identificar los posibles riesgos asociados al uso de nanosistemas, así como diseñar modelos predictivos. Es necesario indicar que entre los parámetros que influyen en el comportamiento biológico de las nanopartículas, se encuentran la composición, el tamaño y la forma. Las nanopartículas cuando son administradas por vía intravenosa interaccionan con las proteínas y otras moléculas presentes en la sangre y los tejidos dando lugar a una estructura cuya composición y espesor varía en función de las propiedades químicas de la superficie del sistema (*Casals y col., 2010; Monopoli y col., 2012*). Varios estudios sugieren

la implicación de estos sistemas en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y procesos inflamatorios, afectando a la BHE y a la microglia presentes en el parénquima cerebral (*Sharma y Sharma, 2012*).

Por otro lado, se han realizado diferentes estudios para evaluar cómo afecta la carga de las nanopartículas a la integridad de la BHE. Dada la carga negativa a nivel luminal de la BHE, diferentes autores han demostrado que nanopartículas neutras o aniónicas no tienen efecto sobre la integridad de la BHE, mientras que nanopartículas catiónicas tienen efectos tóxicos a nivel de la microvasculatura endotelial alterando la integridad y permeabilidad de la barrera (*Lockman y col., 2004*).

Por lo anteriormente comentado, los estudios de toxicidad de las nanopartículas han adquirido una gran importancia en el desarrollo de nanosistemas. Así, en el presente estudio se ha llevado a cabo un estudio de neurotoxicidad *in vivo* con las formulaciones desarrolladas.

En las figuras 7.34 y 7.35 se muestran las microfotografías de los cortes neuronales de hipocampo obtenidos correspondientes al control (solución de rodamina) y a las tres formulaciones ensayadas a los 30 y 60 min.

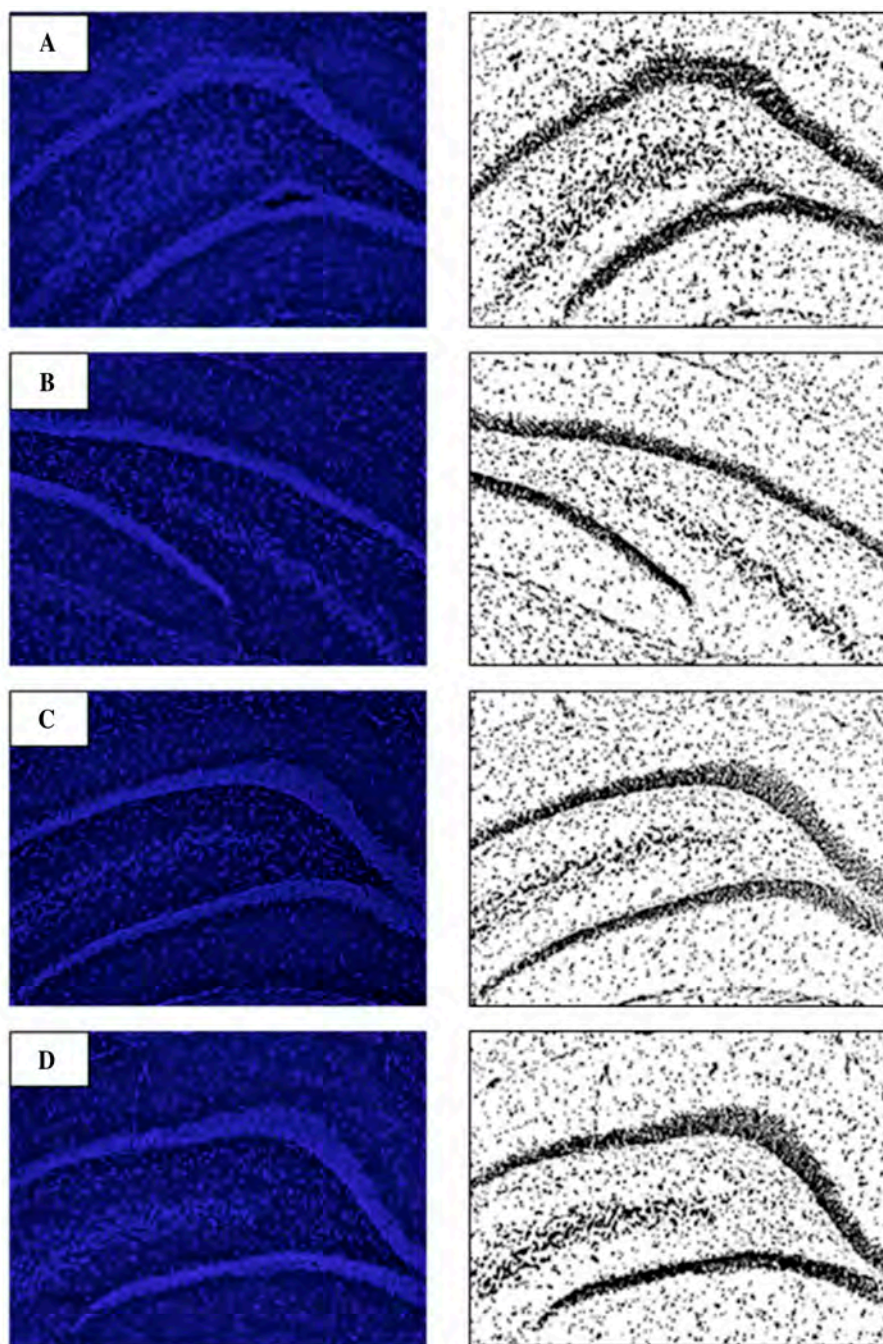


Figura 7.34. Microfotografías de hipocampo correspondiente a: control (A), NPR-1 (B), NPR-2 (C), NPR-3 (D) a los 30 minutos.

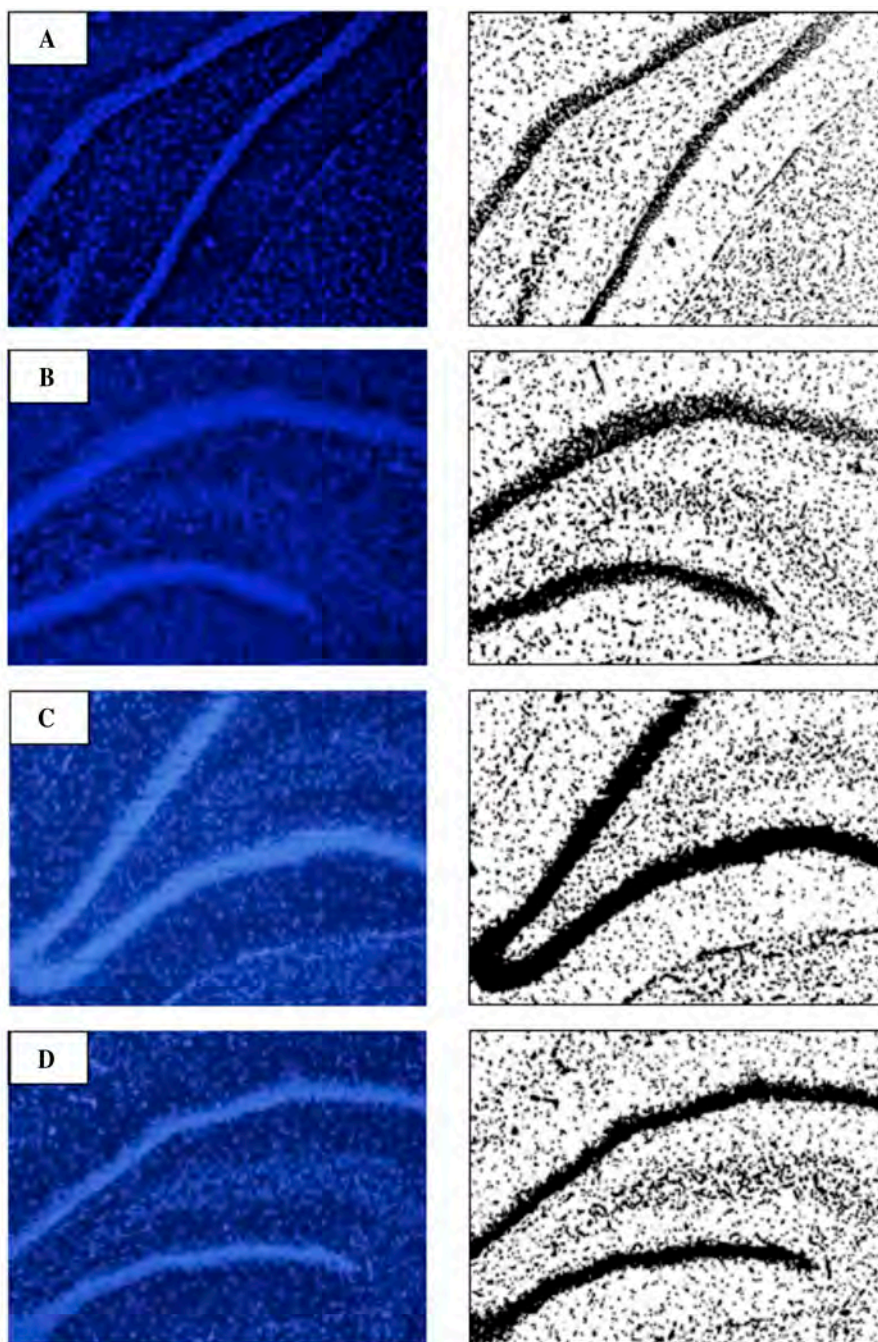


Figura 7.35. Microfotografías de hipocampo correspondiente a: control (A), NPR-1 (B), NPR-2 (C), NPR-3 (D) a los 60 minutos.

En la figura 7.36 se recogen los resultados de viabilidad neuronal obtenidos a partir de la determinación cuantitativa de las neuronas vivas en el hipocampo tras la administración de las tres formulaciones de nanopartículas desarrolladas: NPR-1, NPR-2 y NPR-3, a los dos tiempos preestablecido (30 y 60 minutos). Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas ($p=0,4869$) en la viabilidad celular obtenida en los animales tratados y no tratados, a las dos tiempos de estudios (30 y 60 minutos). Además, tampoco se observó ninguna diferencia en sus comportamientos.

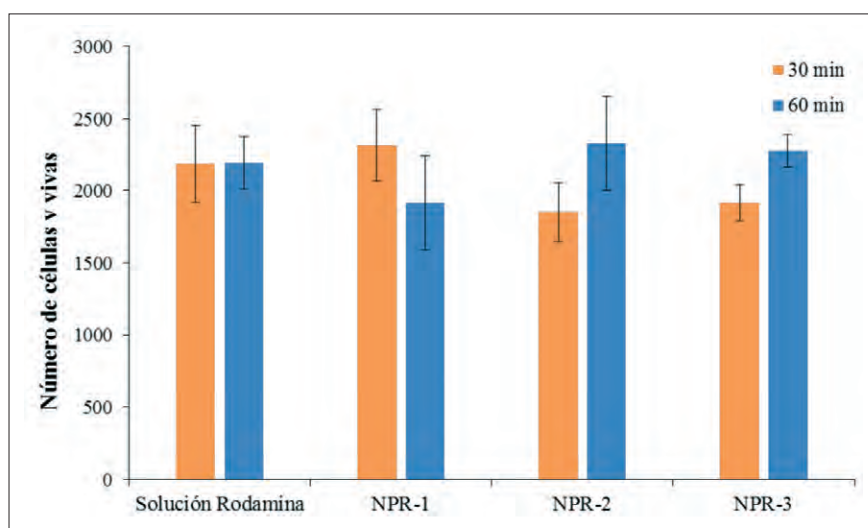


Figura 7.36. Número de células vivas obtenidas en los cortes cerebrales de hipocampo obtenidos a los 30 y 60 min de la administración de las formulaciones NPR-1, NPR-2, NPR-3.

De los resultados obtenidos podemos indicar que en nuestras condiciones de ensayo, las nanopartículas funcionalizadas con polisorbato 80 o labrafil, a las cantidades utilizadas, son biocompatibles, no apreciándose daño en el número de neuronas.

5.6. Evaluación de la distribución *in vivo* de nanopartículas fluorescentes en pulmón e hígado

En las figuras 7.37 y 7.38 se recogen los resultados de la distribución *in vivo* de las nanopartículas fluorescentes elaboradas después de 30 y 60 minutos de su administración. La biodistribución de las nanopartículas en hígado y pulmón se expresa como cantidad de rodamina en el órgano analizado por gramo de órgano.

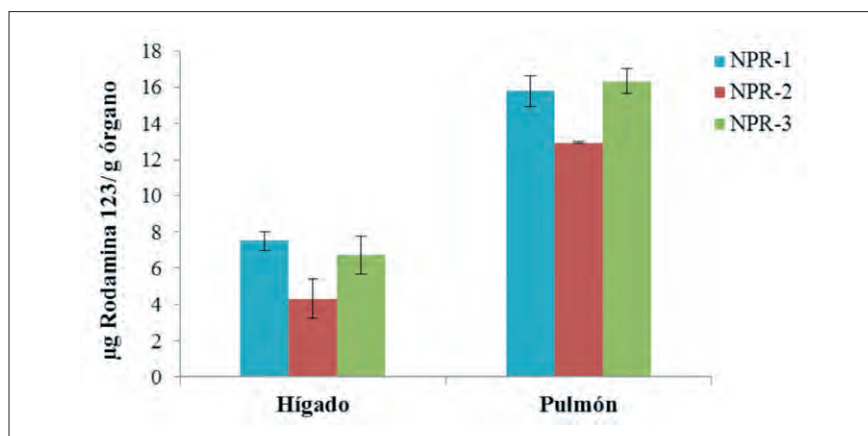


Figura 7.37. Cantidad de rodamina en hígado y pulmón a los 30 min de la administración de las diferentes nanopartículas ensayadas.

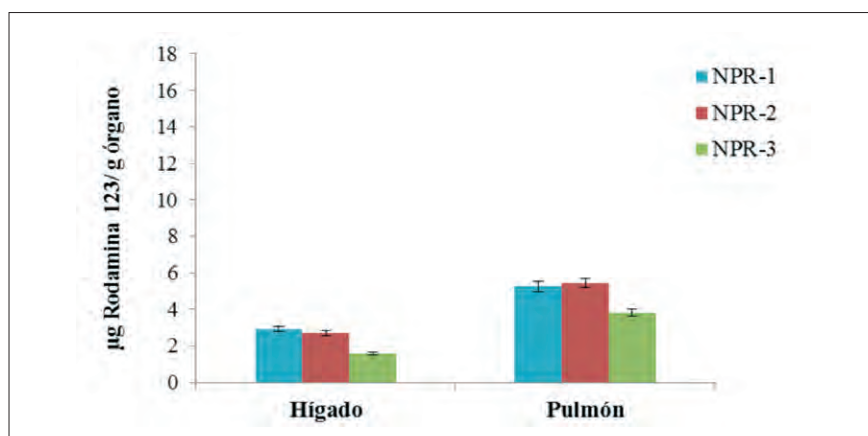


Figura 7.38. Cantidad de rodamina en hígado y pulmón a los 60 min de la administración de las diferentes nanopartículas ensayadas.

Para todas las formulaciones de NPs administradas (NPR-1, NPR-2 y NPR-3), a los dos tiempo de estudio, 30 y 60 minutos, la concentración de rodamina que aparece en pulmón fue superior respecto a la concentración obtenida en hígado.

Algunos autores indican que la fluorescencia medida en los órganos analizados a los 30 min se debe principalmente a la rodamina encapsulada en las nanopartículas y no a la liberada a partir del sistema polimérico, ya que a los 120 min únicamente se libera 15% de la rodamina encapsulada (*Tosi y col., 2010; Vergoni A. V y col., 2009*).

Cuando se analizan los resultados de biodistribución a los 30 minutos de cada una de las formulaciones (Figura 7.37) observamos que en el caso de las nanopartículas recubiertas con polisorbato 80, la concentración de rodamina que se encuentra en pulmón (12,93 µg de rodamina/g de tejido) es tres veces superior a la obtenida en hígado (4,31 µg de rodamina/g de tejido). Resultados similares se han encontrado con la formulación NPR-1 y NPR-3 donde la cantidad de rodamina obtenida en pulmón fue 2,1 y 2,4 veces superior a la concentración en hígado, respectivamente.

Al analizar los resultados obtenidos con las formulaciones funcionalizadas (NPR-2 y NPR-3), a los 30 minutos, observamos que la formulación NPR-3 es la que presenta una mayor distribución en hígado. Esto puede ser debido a que el polisorbato 80 es un tensioactivo iónico con características hidrofílicas que impide la opsonización y por consiguiente su identificación por el sistema fagocítico mononuclear.

A los 60 minutos, las concentraciones de rodamina disminuyeron significativamente en ambos órganos cuando se estudiaron las tres formulaciones de nanopartículas (NPR-1, NPR-2 y NPR-3) (Figura 7.38). Además, las cantidades en pulmón en todos los casos son superiores a las obtenidas en hígado. Esta mayor distribución de las nanopartículas en pulmón, resulta adecuada para conseguir los objetivos de esta memoria, ya que el *Mycobacterium tuberculosis* está presente mayoritariamente en este órgano.

Finalmente mencionar que tal como se ha indicado previamente, a los 60 minutos de la administración de las nanopartículas funcionalizadas (NPR-2 y NPR-3) es cuando encontramos una mayor intensidad de la fluorescencia de la rodamina en corteza cerebral, lo que nos confirma su paso a través de barrera de la barrera hematoencefálica.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alyautdin R. N., Reichel A., Löbenberg R., Ramge P., Kreuter J., Begley D. J. Interaction of poly-(butylcyanoacrylate) nanoparticles with the blood-brain barrier *in vivo* and *in vitro*. *J. Drug Target*, 9: 209-221, 2001.

Ambruosi A., Yamamoto H., Kreuter J. Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [¹⁴C] poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i.v. administration in rats. *J. Drug Target*, 13: 535-542, 2005.

Bawarski N., Chidlowsky E., Bharali D. J., Mousa S. A. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.*, 4: 273-282, 2008.

Brigger I., Morizet J., Laudani L., Aubert G., Appel M., Velasco V., Terrier-Lacombe M-J., Desmaele D., D'Angelo J., Couvreur P., Vassal G. Negative preclinical results with stealth® nanosphere-encapsulated doxorubicin in an orthotropic murine brain tumor model. *J. Control. Release*, 100: 29-40, 2004.

Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G. J., Puentes V. Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano.*, 4: 3623-3632, 2010.

Fonseca C., Simoes S., Gaspar R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and *in vitro* anti-tumoral activity. *J. Control. Release*, 83: 273-286, 2002.

Gaumet M., Vargas A., Gurny R., Delie F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 69: 1-9, 2008.

Hans M. L., Lowman A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 6: 319-327, 2002.

Hillaireau H., Couvreur P. Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery cell. *Mol. Life Sci.*, 60: 2873-2896, 2009.

Kohei T., Sahori F., Hiromitsu Y., Yoshiaki K. Hybrid-modified poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanospheres for a novel cellular drug delivery system. *Int. J. Pharm.*, 392: 311-313, 2010.

Kreuter J. Nanoparticles as drug delivery systems for the brain. In: *Microencapsulation. Meth. Ind. Appl.*, 2: 689-706, 2006.

Kreuter J., Ränge P., Petrov V., Hamm S., Gelperina S. E., Engelhardt B. Direct evidence of polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm. Res.*, 20: 409-416, 2003.

Li S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J. Biomed. Mater. Res.*, 48: 342-353, 1999.

Lockman P. R., Koziara J. M., Mumper R. J., Allen D. D. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J. Drug Target.*, 12: 635-641, 2004.

Lu X. F., Shi Y-F., Ling L. H., Ye-Yun Fu Y-Y., Ma D., Xue W. Preparation and characterization of molecularly imprinted poly (hydroxyethyl methacrylate) microspheres for sustained release of gatifloxacin. *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 25: 1461-1469, 2014.

Martins S., Tho I., Reimold I., Fricker G., Souto E., Ferreira D., Martin B. Brain delivery of camptothecin by means of solid lipid nanoparticles: Formulation design, *in vitro* and *in vivo* studies. *Int. J. Pharm.*, 439: 49-62, 2012.

Michaelis K., Hoffmann M. M., Dreis S., Herbert E., Alyautdin R. N., Michaelis M., Kreuter J., Langer K. Covalent linkage of apolipoprotein E to albumin-nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317: 1246-1253, 2006.

Monopoli M. P., Aberg C., Salvati A., Dawson K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.*, 7: 779-786, 2012.

Mundargi R. C., Babu V. R., Rangaswamy V., Patel P., Aminabhavi T. M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control. Release*, 125: 193-209, 2008.

Pardridge W. M. shRNA and siRNA delivery to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59: 141-152, 2007.

Rocha S. Targeted drug delivery across the blood brain barrier in Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.*, 19: 6635-6646, 2013.

Salvador-Morales C., Zhang L., Langer R., Farokhzad O. C. Immunocompatibility properties of lipid-polymer hybrid nanoparticles with heterogeneous surface functional groups. *Biom.*, 30: 2231-2240, 2009.

Sharma H. S., Sharma A. Neurotoxicity of engineered nanoparticles from metals. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 11: 65-80, 2012.

Steiniger S. C., Kreuter J., Khalansky A. S., Skidan I. N., Bobruskin A. I., Smirnova Z. S., Severin S. E., Uhl R., Kock M., Geiger K. D., Gelperina S. E. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer*, 109: 759-767, 2004.

Suchlfart S., Gelperina S., Kreuter J. Transport of drug across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release*, 161: 264-273, 2012.

Sumner J. P., Kopelman R. Alexa Fluor 488 as an iron sensing molecule and its application in PEBBLE nanosensors. *Analyst.*, 130: 528-533, 2005.

Sun D., Xue A., Zhang B., Lou H., Shi H., Zhang X. Polysorbate 80-coated PLGA nanoparticles improve the permeability of acetylpuerarin and enhance

its brain-protective effects in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 67: 1650-1662, 2015.

Sun J., Simon S. L. The melting behaviour of aluminium nanoparticles. *Thermochim. Acta.*, 463: 32-40, 2007.

Tahara K., Miyazaki Y., Kawashima Y., Kreuter J., Yamamoto H. Brain targeting with surface-modified poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles delivered via carotid artery administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 77: 84-88, 2011.

Tosi G., Vergoni A. V., Ruozi B., Bondioli L., Badiali L., Rivasi F., Costantino L., Forni F., Vandelli M. A. Sialic acid and glycopeptides conjugated PLGA nanoparticles for central nervous system targeting: *In vivo* pharmacological evidence and biodistribution. *J. Control. Release*, 145: 49-57, 2010.

Vera M., Barcia E., Negro S., Marcianes P., García-García L., Slowing K., Fernández-Carballido A. New celecoxib multiparticulate systems to improve glioblastoma treatment. *Int. J. Pharm.*, 473: 518-527, 2014.

Vergoni A. V., Tosi G., Tacchi R., Vandelli M. A., Bertolini A., Costantino L. Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: *in vivo* biodistribution. *Nanomedicine*, 5: 369-377, 2009.

Wohlfart S., Gelperina S., Kreuter J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release*, 161: 264-273, 2012.

You L., Kun W., Fen Z., Shizheng Z. Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *Int. J. Pharm.*, 430: 266-275, 2012.

Yung-Chu C., Wen-Yuan H., Wen-Fu L., Ding-Tai Z. Effects of surface modification of PLGA-PEG-PLGA nanoparticles on loperamide delivery efficiency across the blood -brain barrier. *J. Biom. Appl.*, 2: 1-14, 2011.

Zhang Z., Lu J., Wang Y., Pang Y., Zhao Y. Prevalence and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in China. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58: 364-369, 2014.

VIII. MICROPARTÍCULAS DE GATIFLOXACINO

1. INTRODUCCIÓN

La terapia antituberculosa actual consiste en una combinación de fármacos que son administrados por vía oral y/o parenteral. La vía oral es generalmente la vía de administración más usada sin embargo, muchos fármacos antituberculosos interactúan con los alimentos reduciendo así su absorción. Por otro lado, la vía parenteral permite tener mayor control de la dosis administrada, pero es considerada dolorosa e incómoda para los pacientes, necesitando personal especializado para su administración.

Una de las vías de administración cómoda para los pacientes que puede conseguir una mayor eficacia terapéutica, es la vía pulmonar (*Patton y col., 2007*). En este sentido, se han desarrollado diferentes sistemas de liberación controlada de antituberculosos tales como nano y micropartículas, liposomas, micelas, conjugados poliméricos y dendrímeros para ser administrados por esta vía (*Patel y col., 2014; Nahar y col., 2014; Gupta y col., 2014*).

El bacilo *Mycobacterium tuberculosis* es fagocitado por los macrófagos del pulmón, debido a que estos microorganismos presentan unos receptores específicos de alta afinidad para diversas opsoninas. En el pulmón, existen diferentes tipos de macrófagos que según su localización se clasifican en macrófagos intravasculares, macrófagos pleurales, macrófagos intersticiales y macrófagos alveolares.

Los macrófagos intravasculares son células de 20 a 80 μm de tamaño, con un potencial fagocítico similar al de las células de Kupffer (*Schneberger y col., 2012*). Estas células se localizan en el endotelio vascular, en contacto directo con la circulación sanguínea, lo que les permite retener las partículas extrañas que circulan por el torrente sanguíneo (*Carrasco y col., 2001*).

Los macrófagos pleurales están localizados en el espacio pleural, entre los pulmones y la pleura. Este espacio contiene numerosas células y el 50% de ellas corresponde a estos macrófagos (*Frankenberger y col., 2000*). Se diferen-

cian de los monocitos en la secreción de marcadores de diferenciación como CD14 y CD14/CD16 los cuales juegan un papel importante en la defensa del pulmón. Debido a la alta expresión de interleuquina IL-10, estos macrófagos son catalogados como fagocitos de potencia moderada. Además, son capaces de captar cambios en el ambiente y propagar una respuesta inflamatoria por reclutamiento de neutrófilos (*Cailhier y col., 2006*).

Los macrófagos intersticiales están situados en el delgado compartimento entre el espacio vascular y el epitelio alveolar del tejido conectivo del pulmón (*Landsman y Jung, 2007; Misharin y col., 2011*). Son considerados como macrófagos intermedios entre los monocitos de la sangre y los macrófagos alveolares, representan el 40% de los macrófagos totales del pulmón (*Laskin y col., 2001*).

Los macrófagos alveolares (McFs) constituyen la primera línea de defensa del pulmón y son las principales células responsables de la fagocitosis de las sustancias extrañas inhaladas (*Rubins, 2003*). Cuando los macrófagos alveolares (McFs) reconocen partículas extrañas, sintetizan y secretan una serie de mediadores inflamatorios que atraen a los neutrófilos al espacio alveolar (*Ruge y col., 2012; Schleh y col., 2011; Akei y col., 2006*). Las partículas extrañas son recubiertas por proteínas solubles y opsonizadas uniéndose a receptores localizados en la membrana de los macrófagos (*Greenberg y col., 2002*).

El *M. tuberculosis* tiene la capacidad de sobrevivir y replicarse en los macrófagos alveolares evadiendo así los mecanismos de defensas del hospedador y desarrollando una enfermedad latente. Por este motivo, el desarrollo de formulaciones que se puedan dirigir directamente a los macrófagos alveolares del pulmón supone una alternativa prometedora para el tratamiento de esta enfermedad. Las micropartículas podrían ser una herramienta eficaz para el tratamiento de la tuberculosis mediante la vectorización de fármacos anti-tuberculosos a macrófagos alveolares. Para conseguir esta vectorización, las micropartículas tienen que presentar una serie de características. Así, se sabe que la composición, tamaño, forma, carga superficial y rigidez de las mismas

son algunos de los factores que condicionan su captación por los McFs (*Patel y col., 2015*).

La composición de las partículas afecta directamente a la interacción de las mismas con los receptores localizados en la superficie de los macrófagos. En este sentido, Hirota y col., comprobaron que las micropartículas elaboradas con PLGA son más fácilmente fagocitadas que las elaboradas con poliestireno (*Hirota y col., 2011*).

Diferentes grupos de investigación han desarrollado micropartículas de PLGA cargadas con fármacos antituberculosos de primera línea, como la rifampicina (*O`Hara y Hichey, 2000; Suarez y col., 2001; Sethuraman y Hichey, 2002; Tomoda y Makino, 2007*). Suarez y col., (*Suarez y col., 2001*) al administrar la formulación vía pulmonar por nebulización, observaron una relación dosis dependiente con una reducción significativa en el número de bacterias viables. Coowanitwong y col., (*Coowanitwong y col., 2008*) elaboraron micropartículas con poli-(L-láctico) (PLA), obteniendo niveles sostenidos de rifampicina en el pulmón cuando realizaron estudios *in vivo*, en comparación con la administración del principio activo en solución. Sharma y col., desarrollaron micropartículas de PLA cargadas con dos principios activos; rifampicina e isoniazida, para la administración por vía inhalatoria (*Sharma y col., 2007*). Estos autores comprobaron, en un modelo de ratones, que las micropartículas captadas por los macrófagos infectados por la bacteria, conseguían activar mecanismos inmunitarios, potenciando la actividad de los antibióticos. También Muttill y col., (*Muttill y col., 2007*) elaboraron micropartículas de PLA cargadas con rifabutin como alternativa a la rifampicina e izonizacida. Estos autores consiguieron, en ensayos *in vivo*, concentraciones intracelulares del principio activo cuatro veces superiores a las obtenidas con la administración del principio activo en solución (*Muttill y col., 2007*).

Por otro lado, la tuberculosis resistente a fármacos de primera línea constituye cada día un mayor problema para el tratamiento de la enfermedad. En este sentido, el gatifloxacino supone una alternativa eficaz a los tratamientos

convencionales ya que, permite reducir la larga duración de los tratamientos actuales, minimizando las resistencias (*Ruan Q y col., 2016; Merle y col., 2014*).

Por todo lo anteriormente mencionado, la elaboración de una formulación de microesferas de PLGA que contengan gatifloxacino, para ser administradas por vía pulmonar y que se pueda dirigir directamente a los macrófagos alveolares, podría conseguir una mayor eficacia terapéutica al reducir la dosis de fármaco, las resistencias, la duración del tratamiento y los efectos adversos.

2. OBJETIVO

El principal objetivo es desarrollar una formulación de microesferas biodegradables de gatifloxacino, para ser administradas por vía pulmonar, capaz de acceder a los macrófagos alveolares, actuando directamente en el reservorio del *Mycobacterium tuberculosis*. Con esta formulación se pretende reducir las resistencias, acortar la duración del tratamiento y disminuir las dosis. Para alcanzar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Seleccionar un método de elaboración de micropartículas de PLGA que permita obtener un tamaño medio de partícula de 5 μm y una distribución monodispersa.
2. Desarrollar microesferas de gatifloxacino elaboradas con PLGA resómeros RG[®] 502 y RG[®] 502H, con y sin labrafil M 1944 CS como modificador de la superficie para favorecer su fagocitosis.
3. Caracterizar las formulaciones de gatifloxacino desarrolladas empleando diferentes técnicas analíticas: difracción de rayos láser, microscopía electrónica de barrido (SEM), eficacia de encapsulación y cesión *in vitro* del gatifloxacino.
4. Realizar estudios *in vitro* empleando macrófagos de ratón para evaluar el proceso de fagocitosis de las diferentes formulaciones preparadas con PLGA RG[®] 502 y PLGA RG[®] 502H, con o sin labrafil M 1944 CS.

5. Seleccionar la formulación más adecuada, con un mayor contenido de principio activo y una rápida fagocitosis por parte de los macrófagos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estudios preliminares de fagocitosis

Para llevar a cabo estos estudios, se preparan micropartículas de diferentes tamaños empleando la técnica de evaporación-extracción del solvente a partir de una emulsión O/A. Para ello se disuelven 200 mg del polímero PLGA (RG® 502) en 1 ml de diclorometano. La fase acuosa de la emulsión está formada por 5 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA, PM. 49000 Da, Fluka, España) al 1%. Para formar la emulsión se emplea un homogeneizador Polytron (PT 10-30, Kinemática, Lucerna, Suiza). Se utilizan dos velocidades de agitación para obtener formulaciones con dos tamaños de partícula diferentes:

- F1: 2.000 rpm durante 2 minutos.
- F2: 20.000 rpm durante 2 minutos.

Una vez formada la emulsión, se añaden 6 ml de agua Milli-Q y se agita en el homogeneizador, a la misma velocidad, durante otros 2 minutos. Finalmente, las microesferas inmaduras se suspenden en 250 ml de agua y se mantienen en un agitador magnético (multiagitador magnético A-04 SBS) durante 3 horas para la eliminación del disolvente orgánico. Por último, las microesferas se filtran a vacío (Bomba de vacío NKF Neuberger Inc., EE.UU.), se lavan y se liofilizan.

Estudio de fagocitosis en animales de experimentación

Se realizó un estudio de fagocitosis *ex vivo* con ratones Swiss de pesos comprendidos entre 28 y 32 g. Para llevar a cabo este estudio, se emplearon tres

ratones a los que se les administró por vía intraperitoneal 23,45 mg/kg de peso de microesferas suspendidas en PBS. A uno de los ratones se les administró una inyección de 0,5 ml de labrafil en PBS (3,2 µg/ml). Una vez transcurrido un periodo de 2 horas se realiza un lavado peritoneal con una solución salina que contiene un 10% de albumina de suero bovino (BSA) y se extraen por aspiración las microesferas junto con los macrófagos. Las alícuotas obtenidas se incuban a 37 °C en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino (SFB) durante 72 horas, en una atmósfera con 5% CO₂ y humedad controlada. Transcurridas 2 horas se observan los cultivos al microscopio.

En estos estudios se utilizan las micropartículas preparadas de acuerdo al protocolo indicado en el apartado 3.1. Estudio preliminar de fagocitosis, recogido en este capítulo de la presente memoria experimental.

3.2. Elaboración de micropartículas

La elaboración de las microesferas (MPs) se ha realizado mediante la técnica de evaporación-extracción del solvente a partir de una emulsión O/A. La fase acuosa de la emulsión está compuesta por una solución de PVA de PM = 49.000 Da (Acros Organic, EE.UU.). La fase orgánica está compuesta por 200 mg de polímero (PLGA RG® 502 o PLGA RG® 502H) (Evonik, Alemania) que se disuelve en 4 ml de diclorometano (DCM) (Química S.A., España).

La fase orgánica se añade sobre la fase acuosa con aguja de 30G acoplada a una jeringa, y se mantiene en un homogenizador (Polytron 10-35 GT®, EE.UU.) durante 5 min. A continuación, se procede a la eliminación del disolvente orgánico, para ello la emulsión formada se mantiene en agitación magnética durante 2 horas. Durante este tiempo se produce la precipitación gradual del polímero a medida que se va eliminando el disolvente. Las microesferas obtenidas se separan por filtración con filtros de 0,45 µm (Millipore® SMWP, EE.UU.), se lavan, se resuspenden en 1ml de una solución acuosa de sacarosa al 3% utilizado como crioprotector y se liofilizan (Flexi-Dry MP™, FTS Systems, EE.UU.) durante 24 horas.

La figura 8.1 muestra un esquema general del protocolo de elaboración de las micropartículas.

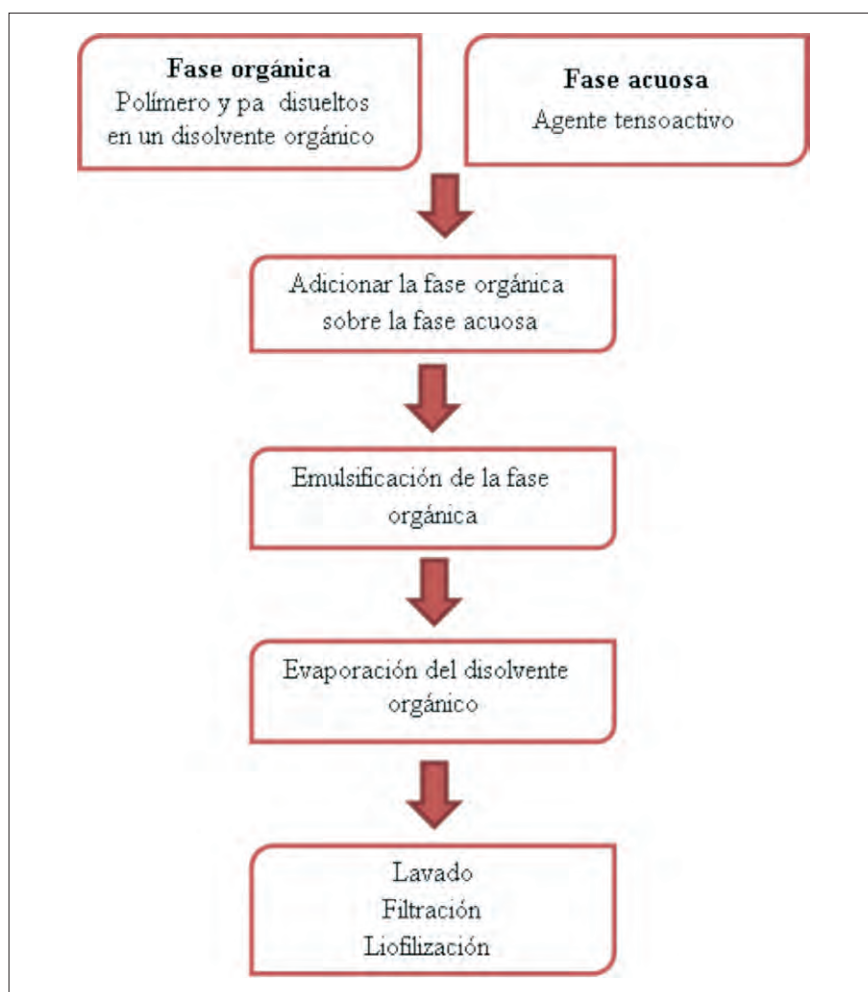


Figura 8.1. Método general de elaboración de las micropartículas por la técnica de extracción y evaporación del solvente.

Elaboración de micropartículas inertes para la selección del tamaño de partícula

Para seleccionar el método que proporcione un tamaño de partícula más adecuado, se preparan micropartículas inertes empleando diferentes polímeros, volúmenes y concentraciones de fase externa, y distintas velocidades de

agitación. En la tabla 8.1 se recogen las diferentes condiciones experimentales utilizadas en la elaboración de las micropartículas.

Formulación	PLGA	PVA-Volumen	RPM
MP-1	502	1% - 20 ml	10.000
MP-2	502	0,5% - 40 ml	10.000
MP-3	502	1% - 12 ml	10.000
MP-4	502	1% - 20 ml	8.500
MP-5	502	0,5% - 20 ml	8.500
MP-6	502H	1% - 20 ml	8.500
MP-7	502H	0,5% - 20 ml	8.500

Tabla 8.1. Condiciones experimentales para la elaboración de microesferas inertes.

Elaboración de micropartículas de gatifloxacino

Para la elaboración de las micropartículas cargadas con gatifloxacino (GAT) se han empleado las condiciones indicadas en la tabla 8.2. El principio activo, 20 mg de GAT (Santa Cruz, Biotech., Inc., EE.UU.), se añaden sobre el polímero disuelto. La fase externa está compuesta por 20 ml de PVA a dos concentraciones (0,5 y 1%) y una velocidad de agitación de 8500 rpm. Para favorecer la encapsulación del principio activo, el pH de la solución de PVA se ajusta a 8,65 con una solución acuosa de fosfato sódico dihidratado (Panreac Química S. A., España).

Formulación	PLGA	GAT	PVA-Volumen	RPM
MP-8	502	10%	0,5% - 20 ml	8.500
MP-9	502	10%	1% - 20 ml	8.500
MP-10	502H	10%	0,5% - 20 ml	8.500
MP-11	502H	10%	1% - 20 ml	8.500

Tabla 8.2. Condiciones experimentales para la elaboración de microesferas cargadas GAT.

También se elaboran microesferas inertes y cargadas con gatifloxacino cuya superficie se modificada con labrafil (Labafil® M1944 CS, Gattefossé, Francia). El protocolo de elaboración es igual al indicado anteriormente, únicamente que se incluye 14 mg del mismo en la fase orgánica de la emulsión (Tabla 8.3). Una vez filtradas y lavadas, las micropartículas son desecadas durante 48 h en desecador a vacío.

Formulación	PLGA	GAT	Labrafil	PVA-Volumen	RPM
MP-12	502	–	14 mg	0,5% - 20 ml	8.500
MP-13	502	10%	14 mg	0,5% - 20 ml	8.500
MP-14	502H	–	14 mg	0,5% - 20 ml	8.500
MP-15	502H	10%	14 mg	0,5% - 20 ml	8.500

Tabla 8.3. Condiciones experimentales para la elaboración de microesferas inertes y cargadas con GAT modificadas con labrafil.

Elaboración de microesferas de fluoresceína para los estudios de fagocitosis

Para los estudios de fagocitosis *in vitro* es necesario la elaboración de MPs con un agente fluorescente: fluoresceína (FITC). En la tabla 8.4 se muestran las formulaciones elaboradas con fluoresceína.

Formulación	PLGA	FITC	Labrafil	PVA-Volumen	RPM
MPF-1	502	10%	-	0,5% - 20 ml	8.500
MPF-2	502	10%	14 mg	0,5% - 20 ml	8.500
MPF-3	502H	10%	-	0,5% - 20 ml	8.500
MPF-4	502H	10%	14 mg	0,5% - 20 ml	8.500

Tabla 8.4. Condiciones experimentales para la elaboración de microesferas cargadas con FITC para los estudios *in vitro*.

4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS

4.1. Estudio de las características morfológicas de las micropartículas

Difracción de rayos láser

Se ha determinado la distribución de tamaños de las micropartículas mediante la técnica de difracción de rayos láser, utilizando el equipo Microtrac® S 35000 Particle Size Analyzer (Microtrac®, EE.UU.). El diámetro medio se expresa como diámetro volumen y la distribución de tamaños se representa gráficamente mediante curvas distributivas de volumen.

Para determinar la homogeneidad de la distribución de tamaños que presentan las formulaciones, se ha calculado el valor de span a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Span} = \frac{\text{Percentil 90-Percentil 10}}{\text{Percentil 50}}$$

Un valor elevado de span indica una distribución heterogénea en la distribución de tamaños. Se considera que una población de micropartículas es monodispersa cuando se obtienen valores de span próximos a 1.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El estudio morfológico de todas las formulaciones se ha realizado mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM, Jeol, JEM-6335, Tokyo, Japón). Las muestras fueron recubiertas con una capa de oro coloidal, agente conductor, de aproximadamente 15 nm durante 3 minutos (Gaumet y col., 2008).

4.2. Determinación del rendimiento del proceso de elaboración y eficacia de encapsulación

El rendimiento del proceso de elaboración se realiza pesando las micropartículas liofilizadas, y determinando el porcentaje obtenido respecto al teórico (P/P). Para determinar el contenido de principio activo, se pesan 10 mg de microesferas, se disuelven en 1 ml de diclorometano, y se agita en vórtex hasta disolver el PLGA. A continuación se añade 15 ml de etanol sobre las muestras, que permite disolver el GAT y consigue la precipitación del polímero. Posteriormente, las muestras se centrifugan durante 5 min a 5.000 rpm. El precipitado es tratado 5 veces con etanol para conseguir la completa extracción del principio activo. Las muestras recogidas se filtran por un filtro de polipropileno de 0,45 µm (Teknokroma Analítica, SA, España).

El contenido de GAT se cuantifica por HPLC de acuerdo al método recogido en el capítulo 6 de la memoria experimental. La eficacia de encapsulación (EE) se calcula a partir de la relación entre el principio activo encapsulado y aquel en disposición de ser encapsulado, a partir de la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{p.a/polímero experimental}}{\text{p.a/polímero teórico}} \times 100$$

También se ha calculado la cantidad de principio activo encapsulada expresada como mg de p.a/100 mg de micropartículas.

En el caso de la formulación recubierta con labrafil (MP-13 y MP-15) se ha considerado el labrafil como excipiente, considerando que toda la cantidad de labrafil incorporada está presente en la formulación.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por HPLC, también se ha cuantificado el GAT encapsulado de forma indirecta por espectrofotometría UV. Para ello, la suspensión de micropartículas obtenidas se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 min y se determinó el contenido de fármaco no encapsulado

en el sobrenadante. El porcentaje de encapsulación se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{p.a en fase orgánica} - \text{p.a en el sobrenadante}}{\text{polímero teórico}} \times 100$$

La cuantificación del contenido de fluoresceína (FITC) para las formulaciones (MPF-1, MPF-2, MPF-3, MPF-4) se llevó a cabo por espectrofotometría UV (Beckman DU-7, Beckman Coulter, EE.UU). Las micropartículas se disuelven con 1 ml de diclorometano, se agitan en vórtex y se le añaden 6 ml de agua, lo que permite la precipitación del polímero y la disolución de FITC. Se filtran con filtros de 0,45 µm de polipropileno (Teknokroma Analítica, SA, España) y se procede a la cuantificación por espectrofotometría ultravioleta-visible a una longitud de onda de 488 nm, realizando las diluciones necesarias para su cuantificación.

4.3. Ensayo de cesión *in vitro*

Los ensayos de cesión se llevan a cabo en un baño termostatzado Memmert WNB 45 (Mettmert®, Alemania). El estudio se ha realizado por triplicado para cada uno de los lotes de acuerdo al siguiente protocolo: Se pesan 10 mg de micropartículas (formulaciones MP-8, MP-10, MP-13 y MP-15). Las micropartículas se suspenden en 3 ml de tampón fosfato ajustado a pH 7,4. Este volumen resulta adecuado para mantener las condiciones *sink* durante todo el ensayo. Las muestras se introducen en un baño termostatzado a 37 ± 0,1 °C con un movimiento constante de 100 rpm.

La toma de muestras se realiza a intervalos de tiempo preestablecidos. Se extraen 2,5 ml del medio con una aguja de 30G acoplada a una jeringa y se renueva con 2,5 ml de solución tampón recién preparada para obtener un volumen final de 3 ml. Con el objetivo de evitar arrastrar las micropartículas y evitar interferencias en la lectura las muestras se centrifugan a 5.000 rpm durante 5 min antes y después de la extracción. A continuación se procede a filtrar las alícuotas

a través de filtros de 0,45 μm de PVDF (Teknokroma Analítica, SA, España). El contenido de principio activo se cuantifica mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución previamente descrito a una longitud de onda de 295 nm.

5. EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL PROCESO DE FAGOCITOSIS DE LAS MICROPARTÍCULAS

Las formulaciones con fluoresceína elaboradas: MPF-1, MPF-2, MPF-3, MPF-4 son evaluadas en una línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 procedente de un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abselon. Para la evaluación de la fagocitosis, se han llevado acabo ensayos de citometría de flujo y microscopía confocal.

Esta línea celular ha sido donada por la Profesora M^a Consuelo Montejo Rubio y procede del *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassaa, VA, EE.UU.). Las células se cultivan bajo condiciones normales (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) en ambiente húmedo a 37 °C, empleando como medio de cultivo RPMI (sigma R8758 + 105% FBS (suero fetal bovino, Sigma F7524) Penicilina-streptomicina-fungizona (Sigma A5955).

Los macrófagos se mantienen en cultivo 48 horas y cuando se encuentran al 80-100% de confluencia, se levantan, se centrifugan, se retira el sobrenadante y se ajustan a la concentración deseada.

5.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular, que permite determinar diferentes características morfológicas tales como tamaño, forma y complejidad celular interna o granularidad relativa.

El fundamento de esta técnica se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células, vivas o fijadas) alineadas por delante de un

haz de láser focalizado a una velocidad o flujo continuo de 500 a 4.000 células por segundo. Las células interactúan con un rayo láser desviando la luz incidente. Las propiedades de dispersión de la luz nos proporciona información acerca del tamaño y granularidad, así pues, la luz dispersada frontalmente es proporcional al tamaño de la partículas (*Forwards Scatter, FS*) mientras que, la luz dispersada lateralmente es proporcional a la complejidad de la estructura celular (*Side Scatter, SSC*).

Si agregamos el uso de moléculas fluorescentes, se amplía enormemente sus posibilidades de detección. Dichas sustancias fluorescentes, al ser iluminadas por la luz láser, emiten señales lumínicas en diferentes longitudes de onda (que son captadas por diferentes detectores) con lo cual podemos obtener información de las propiedades de una población celular.

Para realizar el ensayo, las células se siembran en placas de seis pocillos con 300.000 células/pocillo. A las 72 horas se retira el medio y se añaden las diferentes formulaciones de MPs suspendidas en RPMI a dos concentraciones diferentes 0,5 mg/ml y 0,8 mg/ml. Además se estudian dos concentraciones de labrafil (35 y 70 μ l). Las células se incuban a diferentes tiempos: 3, 5 y 24 horas. A cada uno de los tiempos ensayados se realiza un control.

Se procesan las muestras para su paso por el citómetro de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson, CA, EE.UU.). Para ello, se retira el medio de cultivo, se lavan las células 3 veces con PBS, se levantan con 0,5 ml tripsina, se centrifugan y se resuspenden con PBS y yoduro de propidio (10 μ l).

Por este método se ha determinado la viabilidad celular, la granularidad y la intensidad de fluorescencia empleando una sonda FL1 (530/15 nm) y utilizando como longitud de onda de excitación 488 nm.

5.2. Microscopia confocal

El análisis de las micropartículas fluorescentes se lleva a cabo empleando un microscopio confocal (LEICA TCS-SP5, Leica Microsystems, Alemania).

Este ensayo permite confirmar los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. El estudio se realiza con la misma línea de macrófagos RAW 264.7 en las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Cuando las células alcanzan el 80-100% de confluencia, se levantan, se centrifugan, se retira el sobrenadante y se ajustan a la concentración deseada para realizar el ensayo.

Para llevar a cabo este estudio, las células se siembran en placas individuales de 35mm (Glass bottom IBIDI 81151) con 150.000 células/pocillo durante 48 horas, a continuación se añaden las diferentes formulaciones de MPs con fluoresceína (MPF-1, MPF-2, MPF-3 y MPF-4) a una concentración de 0,8 mg/ml en RPMI y son incubadas durante 3, 5, y 48 horas. Asimismo, se han incubado micropartículas preparados con PLGA 502H cargadas con GAT no modificadas (MP-10) y modificadas con labrafil (MP-15) a una concentración de 0,8 mg/ml durante 24 y 48 h.

Posteriormente se retira el medio de cada pocillo y las células son lavadas 2 veces con PBS. Con el objetivo de teñir los núcleos de las células cada pocillo es tratado con Hoeshst durante 10 min (fluorescencia de color azul). Hoeshst es un agente fluorescente usado para la tinción nuclear ya que se une a los ácidos nucleicos del ADN. El complejo Hoeshst/DNA se excita a una longitud de onda de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 461 nm. La fluorescencia de las muestras con las micropartículas (color verde) fue visualizada mediante el microscopio confocal.

6. RESULTADOS

6.1. Estudios preliminares de fagocitosis

Para seleccionar el tamaño de partícula de las micropartículas que resulte adecuado para la fagocitosis, se realizó previamente un estudio *in vivo*. El protocolo de elaboración de las micropartículas está descrito en el apartado 3.1 de este capítulo. Se obtuvieron dos formulaciones con diferente tamaño

de partícula: F1 con un tamaño medio $40\ \mu\text{m} \pm 4,7$ y, F2 con tamaños medios comprendidos entre $1\text{-}25\ \mu\text{m}$ y una distribución polidispersa. La elevada polidispersión obtenida en la formulación F2 hizo necesario eliminar las partículas de mayor tamaño, para ello la suspensión de micropartículas se filtra dos veces a través de $5\ \mu\text{m}$ y $0,45\ \mu\text{m}$. Los ensayos *in vivo* se llevan a cabo con la fracción comprendida entre ambos tamaños ($0,45\text{-}5\ \mu\text{m}$).

En las figuras 8.2 y 8.3 se muestran las fotografías obtenidas en el ensayo *ex vivo* de macrófagos de ratón correspondientes a la formulación F1 y F2.

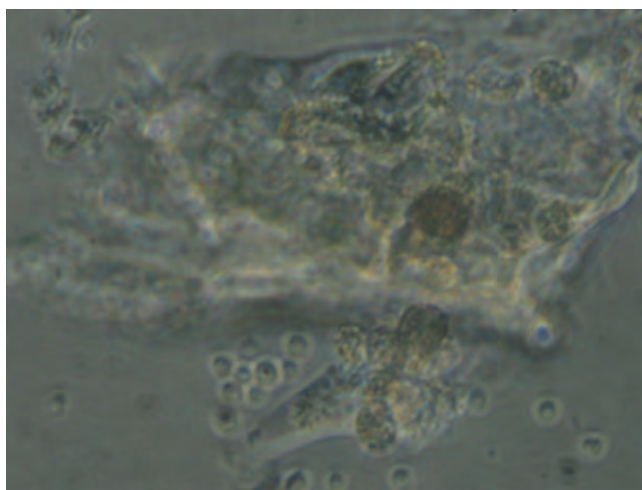


Figura 8.2. Microfotografía correspondiente a la formulación F1 y macrófagos murinos después de 72 horas de incubación.

En la figura 8.2 se observa la formación de una célula espumosa grande. Este fenómeno es denominado fenómeno de Birchoof. El macrófago ante la presencia de cuerpos extraños grandes (F1 tamaño medio de $40\ \mu\text{m}$) se activa para intentar fagocitar a las microesferas.

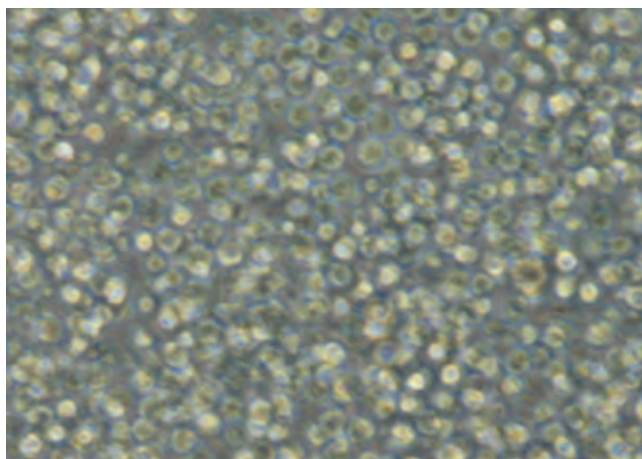


Figura 8.3. Microfotografía correspondiente a la formulación F2 y macrófagos murinos después de 72 horas de incubación.

En la figura 8.3 no se observan microesferas, lo que nos podría indicar que han sido fagocitadas por los macrófagos sin embargo, no podemos asegurar que este hecho se haya producido.

Para evaluar la citotoxicidad del labrafil, se administró 0,5 ml de una dispersión de labrafil (3,2 $\mu\text{g/ml}$) a uno de los ratones. La figura 8.4 muestra una microfotografía correspondiente al labrafil y los macrófagos murinos tras 72 horas de incubación.

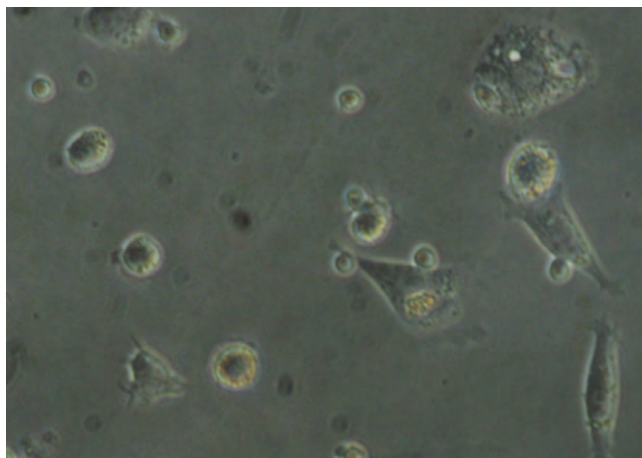


Figura 8.4. Microfotografía correspondiente a labrafil y macrófagos murinos después de 72 horas de incubación.

Los resultados obtenidos con el labrafil, no mostraron citotoxicidad a la concentración ensayada, sin embargo, como puede observarse en la figura 8.4, el labrafil activa a los macrófagos. El término “macrófago activado” implica que las células pueden aumentar su capacidad fagocítica y digestiva.

6.2. Caracterización de las formulaciones

Distribución de tamaños y rendimiento del proceso

En una primera etapa y con el fin de establecer las condiciones más adecuadas para obtener micropartículas destinadas a su administración por vía pulmonar útiles para el tratamiento de la tuberculosis, se ha llevado a cabo la optimización del método de elaboración. Se utilizó como técnica de preparación el método de extracción evaporación del disolvente. En la optimización, se han considera los siguientes variables: concentración de PVA, volumen de la fase externa, variaciones en la velocidad de agitación, así como la utilización de dos polímeros diferentes: PLGA 502 y PLGA 502H (Tabla 8.1). En la tabla 8.5 se muestran los valores del diámetro medio y de span obtenidos para las diferentes formulaciones desarrolladas.

Todas las formulaciones de micropartículas inertes no modificadas con labrafil (MP-1 a MP-7) mostraron tamaños de partícula que oscilaron entre 3,45 y 5,17 μm . Por tanto, dicho tamaño se considera adecuado para la obtención de formulaciones destinadas a la administración por vía pulmonar en las que se desea el acceso de fármaco a nivel alveolar y su captación por macrófagos.

El tamaño de las partículas es un factor determinante en el reconocimiento de las mismas por parte de los macrófagos (*Chono y col., 2006*). Así, Hirota y col., en un estudio *in vitro* realizado con partículas de PLGA cargadas con rifampicina pusieron de manifiesto que las micropartículas con tamaños comprendidas entre 1-6 micras presentan mayor captación en comparación con

aquellas partículas de tamaños menores (*Hirota y col., 2007*). Partículas demasiado grandes y/o demasiado pequeñas no son reconocidas por los macrófagos (*Gupta y col., 2013*).

En la tabla 8.5 se muestran los resultados de rendimiento del proceso, diámetro medio y span obtenidos para las formulaciones MP-1 a MP-7.

Formulación	Diámetro medio (μm) \pm DE	Span	Rendimiento medio proceso (%) \pm DE
MP-1	4,44 \pm 2,15	1,64	44,61 \pm 5,62
MP-2	3,90 \pm 2,03	2,41	42,55 \pm 8,41
MP-3	3,45 \pm 1,70	1,02	41,58 \pm 6,34
MP-4	3,55 \pm 1,30	1,14	55,32 \pm 3,46
MP-5	5,63 \pm 3,20	1,20	61,79 \pm 2,37
MP-6	4,36 \pm 1,13	1,05	57,34 \pm 4,78
MP-7	5,17 \pm 2,99	1,11	69,59 \pm 2,15

Tabla 8.5. *Diámetro medio, span y rendimiento medio del proceso de elaboración obtenidos para las MPs inertes. (Formulación MP-1 a MP-7).*

Las formulaciones MP-1 y MP-2, elaboradas con una velocidad de agitación de 10000 rpm, presentaron valores de span superiores a 1,5, lo que indicaba una mayor polidispersión en la distribución de tamaños. Además, estas formulaciones presentan valores de rendimiento del proceso inferiores a los obtenidos con una velocidad de agitación inferior. A la vista de los resultados obtenidos, se selecciona como condiciones experimentales para continuar los estudios la velocidad de agitación de 8.500 rpm.

Así pues, se continuaron los estudios utilizando 20 ml de fase externa y una agitación de 8.500 rpm. Para seleccionar la formulación que consiga

una mayor encapsulación de GAT, se elaboran micropartículas empleando los dos porcentajes de PVA (0,5% y 1%) estudiados. Se prepararon un total de 4 formulaciones cargadas con gatifloxacino (MP-8 a MP-11).

En la tabla 8.6 se muestran los resultados de rendimiento del proceso, diámetro medio y span obtenidos para estas formulaciones.

Formulación	Diámetro medio (μm) \pm DE	Span	Rendimiento medio proceso (%) \pm DE
MP-8	$4,86 \pm 2,55$	1,07	$45,62 \pm 2,48$
MP-9	$3,96 \pm 1,63$	1,28	$40,19 \pm 3,22$
MP-10	$3,95 \pm 0,4$	1,23	$63,59 \pm 1,50$
MP-11	$6,43 \pm 3,80$	1,92	$40,31 \pm 2,76$

Tabla 8.6. Diámetro medio, span y rendimiento medio del proceso de elaboración obtenidos para las MPs cargadas con GAT. (Formulación MP-8 a MP-11).

Los resultados de diámetro medio obtenidos para las formulaciones cargadas con GAT (MP-8 a MP-11), oscilaron entre 3,96 y 6,43 μm . Con estas formulaciones se pudo comprobar que al aumentar la concentración de PVA se favorecía la agregación de las partículas.

Los valores del rendimiento medio de elaboración para las micropartículas cargadas con gatifloxacino (MP-8 a MP-11) oscilaron entre $40,19 \pm 3,22\%$ y $63,59 \pm 1,50\%$. Dicho rendimiento disminuyó ligeramente al aumentar la concentración de PVA utilizada durante el proceso de elaboración.

Con el fin de mejorar la capacidad de las micropartículas por parte de los macrófagos, se prepararon MPs inertes modificadas con labrafil debido a que, en los estudios preliminares realizados, este componente podría favorecer la fagocitosis. También se elaboran micropartículas con GAT

con la superficie modificada con labrafil de acuerdo al protocolo indicado anteriormente en la tabla 8.3. Estas formulaciones se elaboran únicamente con el PVA al 0,5%.

Formulación	Diámetro medio (μm) \pm DE	Span	Rendimiento medio proceso (%) \pm DE
MP-12	$4,70 \pm 1,84$	1,17	$55,47 \pm 1,00$
MP-13	$4,74 \pm 1,05$	1,05	$50,81 \pm 4,54$
MP-14	$4,28 \pm 1,08$	1,15	$45,39 \pm 2,45$
MP-15	$4,53 \pm 0,81$	1,30	$45,86 \pm 3,54$

Tabla 8.7. *Diámetro medio, span y rendimiento medio del proceso de elaboración obtenidos para las MPs modificadas con labrafil. (Formulación MP-12 a MP-15).*

Los resultados de diámetro medio para las formulaciones modificadas con labrafil, oscilaron entre 4,28 y 4,74 μm no observándose diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$) con valores de span próximos a la unidad, y por tanto poblaciones monodispersas.

El rendimiento medio del proceso para las micropartículas no cagadas y cargadas con labrafil fueron similares, con valores medios que oscilaron entre $45,39 \pm 2,45\%$ y $55,47 \pm 1,00\%$. No observando diferencias significativas entre polímeros, ni entre formulaciones cargadas y no cargadas. En la figura 8.5 se muestran, a modo de ejemplo, las curvas distributivas del tamaño de algunas formulaciones desarrolladas.

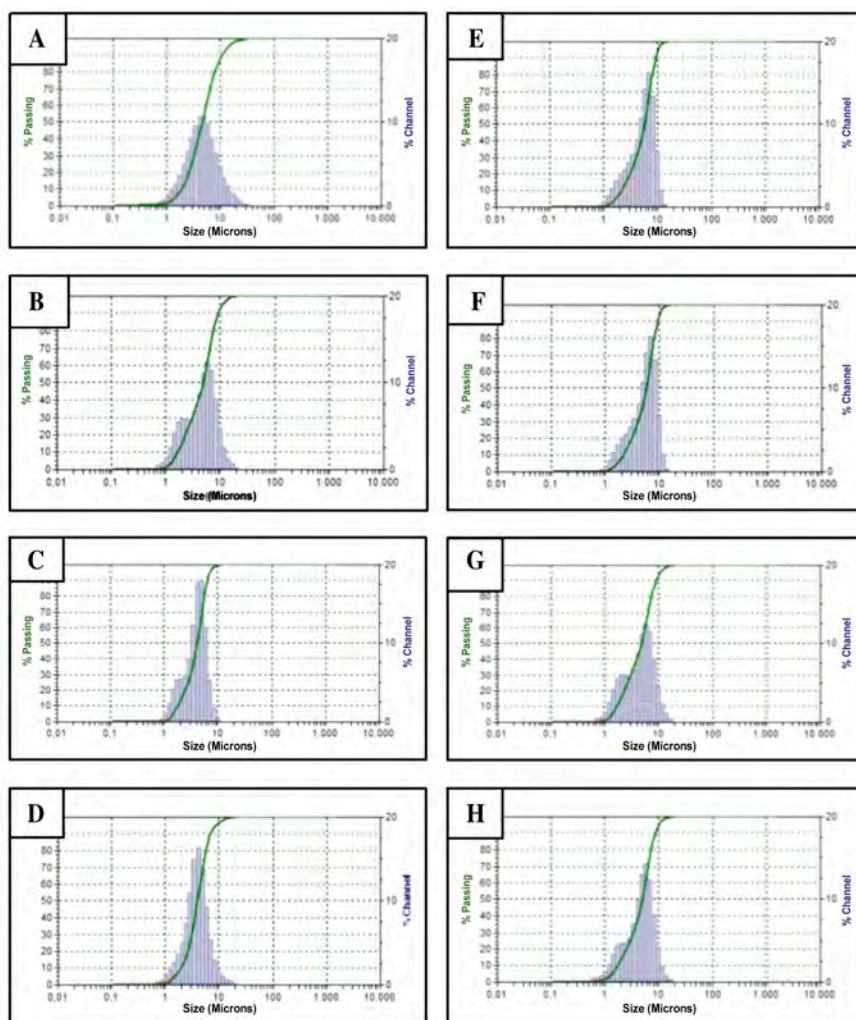


Figura 8.5. Distribución de tamaño obtenida para las MPs elaboradas: MP-5 (A), MP-7 (B), MP-8 (C), MP-10 (D), MP-12 (E), MP-13 (F), MP-14 (G) y MP-15 (H).

Los resultados de diámetro medio obtenidos para las formulaciones con GAT se encuentran entre 3,96 y 5,74 μm exceptuando la formulación MP-11. El tamaño de partícula es un factor fundamental para la vía de administración pulmonar. Las partículas mayores de 10 μm van a quedar retenidas principalmente en la región orofaríngea. Las partículas con tama-

ños entre de 2-5 μm llegan a los alveolos y es allí donde se encuentran los macrófagos alveolares.

Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos indicar que todas las formulaciones cargadas con GAT excepto la MP-11, presentan un tamaño adecuado y una población monodispersa por lo que podrán alcanzar los alveolos y ser fagocitadas por los macrófagos.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la figura 8.6 se muestran, a modo de ejemplo, las microfotografías obtenidas por SEM de las micropartículas blancas elaboradas con el polímero PLGA RG[®] 502 (formulación MP-5) (A), micropartículas elaboradas con el polímero PLGA RG[®] 502 cargadas con GAT (formulación MP-8) (B), micropartículas blancas elaboradas con el polímero PLGA RG[®] 502 modificadas con labrafil (formulación MP-12) (C), micropartículas blancas elaboradas con el polímero PLGA RG[®] 502H (Formulación MP-7) (D), micropartículas elaboradas con el polímero PLGA RG[®] 502H cargadas con GAT (Formulación MP-10) (E) y micropartículas blancas elaboradas con el polímero PLGA RG[®] 502H modificadas con labrafil (formulación MP-14) (F).

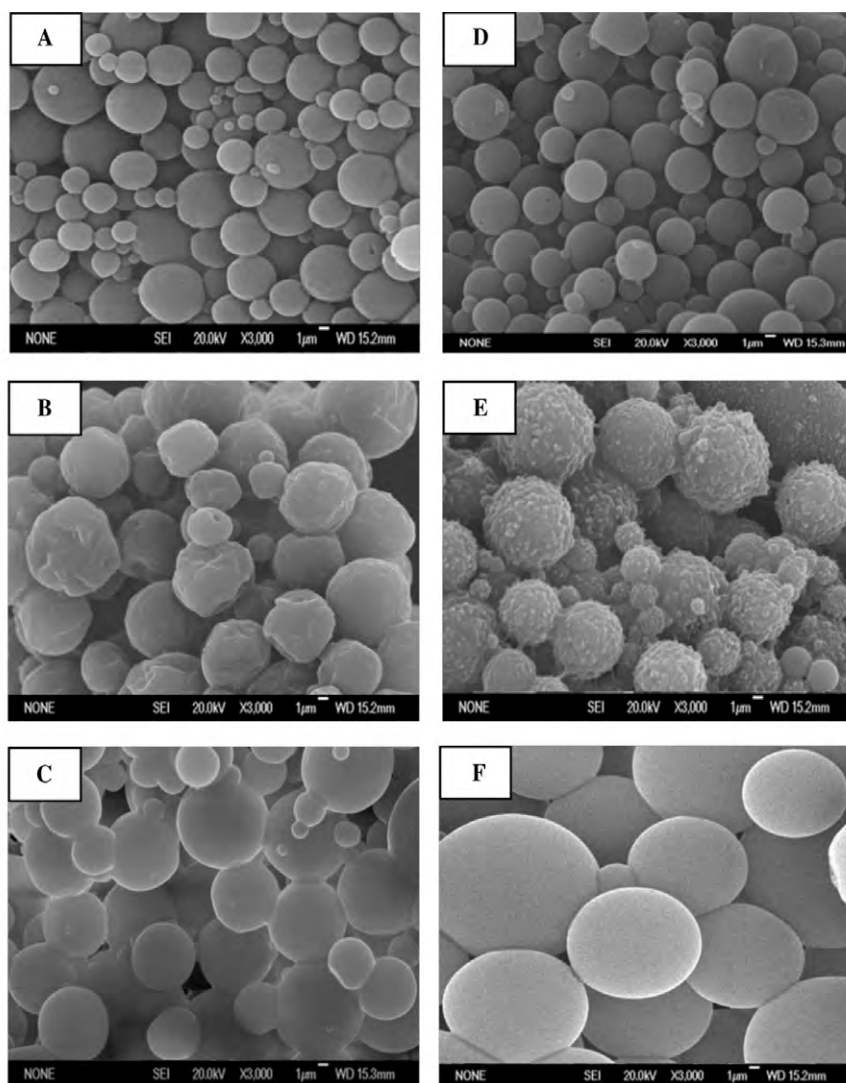


Figura 8.6. Microfotografías obtenidas por SEM para las MPs elaboradas: MP-5 (A), MP-8 (B), MP-12 (C), MP-7 (D), MP-10 (E) y MP-14 (F).

Los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido nos permite comprobar que, las micropartículas blancas son rígidas y esféricas con superficie lisa con independencia del polímero con el cual se hayan elaborado (Figura 8.6 microfotografía A y D). Algunos autores han demostrado que la rigidez es un parámetro importante en el reconocimiento e interacción con los McFs. Así pues, Benigno y col., han demostrado que las partículas duras y

rígidas de poliacrilamidas son más fácilmente internalizadas por macrófagos que las partículas menos rígidas (*Beningo y col., 2002*).

Por el contrario, las micropartículas cargadas con GAT (Figura 8.6 microfotografías B y E) presentan una superficie rugosa no homogénea con independencia del polímero utilizado en la elaboración, por lo que podemos afirmar que la presencia del principio activo modifica la superficie polimérica independientemente del polímero empleado en su elaboración. Probablemente, la modificación se deba a la presencia del principio activo adsorbido en la superficie del sistema polimérico.

Las micropartículas modificadas con labrafil presentan también una superficie esférica y lisa, sin embargo, se aprecia una mayor aglomeración en comparación con las micropartículas no modificadas (Figura 8.6 microfotografías C y F). Esta aglomeración, debida al labrafil, es más acusada en las micropartículas elaboradas con el polímero 502 donde se aprecia una película en la superficie del sistema polimérico responsable probablemente de mantener las partículas unidas (Figura 8.6 microfotografía C).

Estudios recientes realizados por Champion y col., han indicado que la forma de las micropartículas juega un papel importante en su captación por macrófagos alveolares (*Champion y col., 2006*). Así, al estudiar la captación de las micropartículas utilizando la línea de celular NR8383 de macrófagos alveolares encuentran que las micropartículas con forma esférica son más fácilmente captadas en comparación con aquellas de forma alargadas. Por otra parte, las partículas con forma de bastón resultaron ser resistentes a la fagocitosis (*Yoo y col., 2010; Geng y col., 2007*).

6.3. Cantidad encapsulada y eficacia de encapsulación de las formulaciones de gatifloxacino

Con el fin de seleccionar las condiciones experimentales óptimas del proceso de elaboración de las microesferas cargadas con GAT, se evaluó la eficacia de encapsulación y la cantidad de fármaco encapsulada de las formulaciones desarrolladas.

En la tabla 8.8 se presentan los resultados de eficacia de encapsulación y cantidad de fármaco encapsulada obtenidos para las formulaciones elaboradas con gatifloxacino, con y sin la superficie modificada con labrafil.

Formulación	PLGA-PVA	Cantidad encapsulada media ($\mu\text{g}/100 \text{ mg de MPs}$) \pm DE	EE media (%) \pm DE
MP-8	502-0,5%	514,33 \pm 1,52	7,25 \pm 0,09
MP-9	502-1%	499,04 \pm 0,45	6,79 \pm 0,19
MP-10	502H-0,5%	4.334,16 \pm 0,67	57,90 \pm 4,36
MP-11	502H-1%	1.524,46 \pm 1,88	19,73 \pm 1,53
MP-13	502-0,5%	2.442,66 \pm 1,87	34,23 \pm 1,56
MP-15	502H-0,5%	5.984,28 \pm 1,25	89,59 \pm 0,19

Tabla 8.8. Cantidad encapsulada media y eficacia de encapsulación de GAT obtenida para las MPs elaboradas.

A la vista de los resultados obtenidos vemos que, al aumentar la concentración de PVA, disminuye la eficacia de encapsulación de GAT independientemente del polímero utilizado. Este hecho es debido a la mayor afinidad que presenta el principio activo por la fase externa de la emulsión, probablemente como consecuencia del incremento en el porcentaje de tensioactivo que favorece la migración del gatifloxacino hacia la fase acuosa.

Por otro lado, la utilización del polímero 502H aumenta significativamente la eficacia de encapsulación de GAT (MP-10 y MP-15). Esto puede ser debido a la presencia de un mayor número de grupos hidrofílicos en este polímero, lo que favorece la encapsulación de fármacos más hidrófilos. Los valores más elevados de la cantidad encapsulada media de las micropartículas sin labrafil se obtuvieron para la formulación MP-10, con un valor de 4334,16 \pm 0,67 $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ de microesferas, lo que representa una eficacia media de encapsulación del 57,90% \pm 4,36. Dichas micropartículas han sido preparadas con PVA a una concentración de 0,5% y utilizando como polímero el PLGA 502H.

La eficacia de encapsulación de las micropartículas modificadas con labrafil aumenta significativamente respecto a las mismas sin modificar. Este hecho lo podemos atribuir fundamentalmente a que el labrafil es una sustancia anfifílica que probablemente modifique la afinidad y/o solubilidad del gatifloxacino en la fase interna favoreciendo su permanencia en la misma. Por otro lado, la presencia del labrafil conlleva un aumento en la viscosidad de dicha fase pudiendo dificultar la difusión del p.a hacia la fase acuosa. Los valores más elevados de eficacia de encapsulación fueron obtenidas para la formulación MP-15, elaborada con el polímero más hidrófilo PLGA RG 502H y con labrafil, con una eficacia media de encapsulación de $89,59 \pm 0,19\%$.

6.4. Ensayos de cesión *in vitro*

Los ensayos de cesión *in vitro* de GAT a partir de las formulaciones se realizaron por triplicado de acuerdo al protocolo indicado en el apartado 4.3 de este capítulo. En las tablas 8.9 a 8.12 se muestran las cantidades y porcentajes cedidos acumulados de GAT para las formulaciones cargadas con gatifloxacino sin labrafil (MP-8 y MP-10) y modificadas con labrafil (MP-13 y MP-15).

Tiempo (h)	Cantidad cedida acumulada media (μg) \pm DE	% Cedido acumulado medio \pm DE
1	$5,71 \pm 0,32$	$5,39 \pm 0,31$
24	$36,72 \pm 2,01$	$34,64 \pm 1,89$
48	$60,84 \pm 1,51$	$57,40 \pm 1,42$
72	$74,78 \pm 0,01$	$70,54 \pm 0,01$
96	$84,56 \pm 0,41$	$79,78 \pm 0,39$
144	$94,78 \pm 0,89$	$89,42 \pm 0,84$
168	$100,15 \pm 0,92$	$94,48 \pm 0,87$
216	$102,87 \pm 1,12$	$97,04 \pm 1,06$
336	$102,91 \pm 0,98$	$97,04 \pm 0,93$

Tabla 8.9. Cantidades (\pm DE) y porcentajes medios cedidos acumulados (\pm DE) de GAT correspondientes a la formulación MP-8.

Tiempo (h)	Cantidad cedida acumulada media (μg) ± DE	% Cedido acumulado medio ± DE
1	44,31 ± 11,72	8,21 ± 1,23
24	231,89 ± 23,78	42,98 ± 2,42
48	396,51 ± 29,47	73,49 ± 2,94
72	477,73 ± 30,68	88,55 ± 3,03
96	510,05 ± 35,59	94,54 ± 3,54
144	525,44 ± 38,79	97,39 ± 3,87
168	533,48 ± 41,06	98,88 ± 4,11
216	537,96 ± 42,18	99,71 ± 4,23
336	539,49 ± 43,37	99,80 ± 4,11

Tabla 8.10. Cantidades (± DE) y porcentajes medios cedidos acumulados (± DE) de GAT correspondientes a la formulación MP-10.

Tiempo (h)	Cantidad cedida acumulada media (μg) ± DE	% Cedido acumulado medio ± DE
1	22,56 ± 2,82	7,70 ± 0,77
24	103,05 ± 9,60	35,17 ± 3,39
48	170,14 ± 20,14	58,07 ± 5,41
72	208,21 ± 24,46	71,06 ± 6,09
96	233,49 ± 21,90	79,69 ± 5,57
144	258,16 ± 16,50	88,11 ± 4,24
168	270,41 ± 13,75	92,29 ± 3,54
216	275,88 ± 11,23	94,16 ± 3,05
336	282,88 ± 10,71	96,51 ± 2,71

Tabla 8.11. Cantidades (± DE) y porcentajes medios cedidos acumulados (± DE) de GAT correspondientes a la formulación MP-13.

Tiempo (h)	Cantidad cedida acumulada media (µg) ± DE	% Cedido acumulado medio ± DE
1	59,11 ± 2,44	7,70 ± 0,29
24	332,27 ± 9,56	43,31 ± 1,12
48	580,35 ± 15,68	75,65 ± 1,83
72	690,12 ± 6,45	89,95 ± 0,75
96	731,52 ± 0,84	95,35 ± 0,10
144	749,25 ± 1,00	97,66 ± 0,12
168	758,77 ± 1,61	98,90 ± 0,19
216	764,38 ± 1,86	99,63 ± 0,22
336	767,19 ± 1,61	99,70 ± 0,11

Tabla 8.12. *Cantidades (± DE) y porcentajes medios cedidos acumulados (± DE) de GAT correspondientes a la formulación MP-15.*

En las figuras 8.7 y 8.8 se muestran los perfiles de cesión de gatifloxacino obtenidos para las formulaciones MP-10 y MP-15, respectivamente. Estas figuras corresponden a los resultados de las formulaciones preparadas con el polímero PLGA 502H con y sin labrafil respectivamente, ya que presentan un mayor rendimiento de encapsulación.

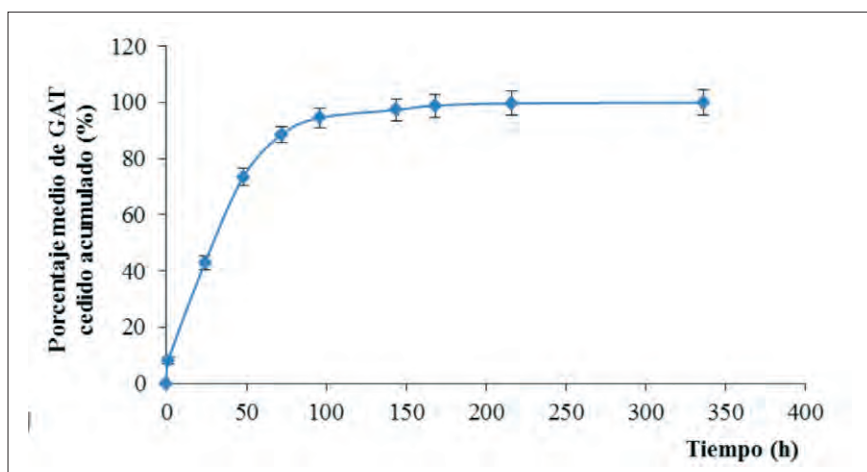


Figura 8.7. Porcentajes medios cedidos acumulados de GAT correspondientes a la formulación MP-10.

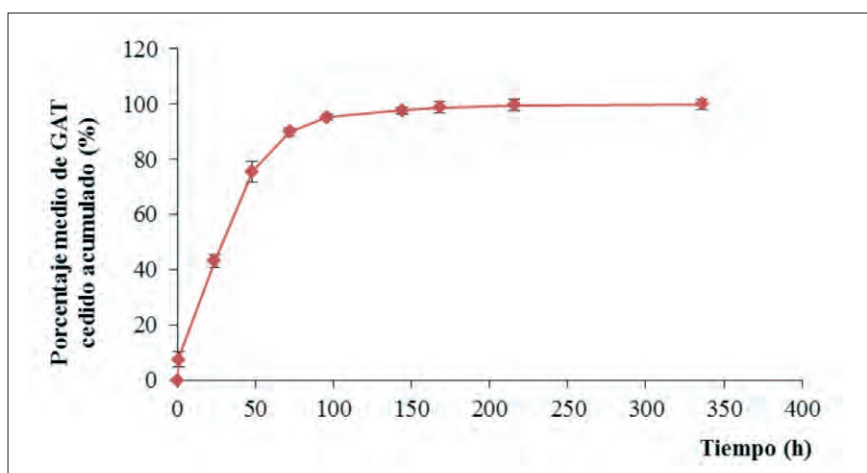


Figura 8.8. Porcentajes medios cedidos acumulados de GAT correspondientes a la formulación MP-15.

A la vista de los resultados, observamos una rápida cesión del gatifloxacino durante 48 horas. En las primeras 24 horas se libera entre el 35 y el 43% del fármaco encapsulado.

Si tenemos en cuenta que nuestro objetivo es vectorizar el activo a macrófagos, nos interesa que la fagocitosis sea lo más rápida posible para conseguir que la mayor cantidad de gatifloxacino sea liberado en el interior de la célula.

El *M. tuberculosis* posee un ciclo de replicación extremadamente lento (15-20 h) en macrófagos alveolares, por tanto las 48 horas de liberación nos resultan adecuadas para controlar su multiplicación en el interior de la célula. Por otro lado, teniendo en cuenta que la vía de administración pulmonar es bien aceptada por los pacientes, se podrían administrar las micropartículas cada 24 o 48 horas.

6.5. Evaluación *in vitro* del proceso de fagocitosis

Caracterización de las formulaciones elaboradas con fluoresceína

Distribución de tamaños de las micropartículas de fluoresceína por difracción de rayos láser

Con el fin de estudiar la captación por macrófagos de las formulaciones se prepararon micropartículas cargadas con fluoresceína (MPF-1 a MPF-4) (Tabla 8.4), que se evaluaron en la línea celular RAW 264.7 de macrófagos procedentes de ratón.

En la tabla 8.13 se muestran los resultados del tamaño medio de partículas obtenidos para las formulaciones MPF-1 a MPF-4. Hirota y col., han estudiado la captación de micropartículas en una línea celular NR8383 de macrófagos alveolares. Estos autores indican que la captación por los macrófagos, es mayor en las micropartículas cuyos tamaños están comprendido entre 1-6 μm respecto a las que presentan un tamaño inferior o superior (Hirota y col., 2007). En nuestro caso, las formulaciones desarrolladas presentaron tamaños de partícula entre 3-5 micras, por tanto adecuados para la fagocitosis.

Formulación	Diámetro medio volumen (μm) \pm DE	Span
MPF-1	4,44 \pm 2,15	1,26
MPF-2	3,90 \pm 2,03	1,97
MPF-3	3,45 \pm 1,70	1,28
MPF-4	3,55 \pm 1,30	1,86

Tabla 8.13. Diámetro medio volumen y span obtenidos para las MPs cargadas con FITC. (Formulación MPF-1 a MPF-4).

Los valores de span aumentaron en las micropartículas modificadas con el labrafil (MPF-2 y MPF-4) debido, probablemente, a la presencia del surfactante sobre la superficie de las micropartículas lo que origina una distribución menos homogénea (Tabla 8.13).

En la figura 8.9 se muestran, a modo de ejemplo, las curvas distributivas de tamaños correspondientes a las formulaciones MPF-1 a MPF-4.

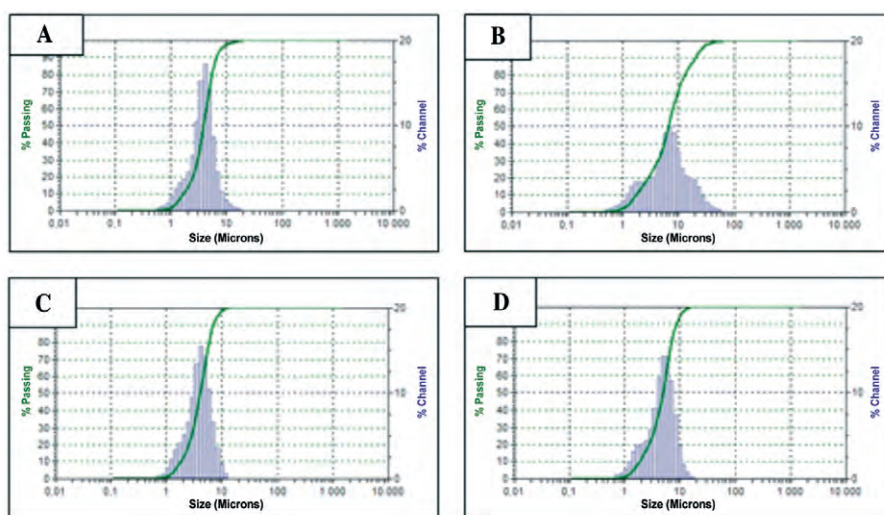


Figura 8.9. Distribución de tamaño obtenida para las MPs cargadas con FITC: MPF-1 (A), MPF-2 (B), MPF-3 (C), MPF-4 (D).

Eficacia de encapsulación y cantidad encapsulada en las micropartículas de fluoresceína

En la tabla 8.14 se presentan los resultados de eficacia de encapsulación de las formulaciones cargadas con FITC.

Formulación	Cantidad encapsulada media	
	($\mu\text{g}/100 \text{ mg de MPs}$) \pm DE	EE media (%) \pm DE
MPF-1	126,17 \pm 1,14	1,5 \pm 0,76
MPF-2	145,19 \pm 1,23	1,90 \pm 0,80
MPF-3	385,86 \pm 1,19	4,82 \pm 0,12
MPF-4	182,32 \pm 2,35	2,40 \pm 0,43

Tabla 8.14. Cantidad encapsulada media y eficacia de encapsulación media de FITC obtenida para las MPs elaboradas. (Formulación MPF-1 a MPF-4).

El valor más elevado de eficacia media de encapsulación ($4,82 \pm 0,12\%$) se han obtenidos para las micropartículas elaboradas con el polímeros 502H modificadas con labrafil (MPF-3), seguida del obtenido para las micropartículas elaboradas con el mismo polímero y modificadas con labrafil (MPF-4), con un valor $2,40 \pm 0,43\%$. Esto puede ser debido a las características hidrofílicas del polímero que favorece la encapsulación de la FITC. Las micropartículas elaboradas con el polímero 502 no modificadas (MPF-1) y modificadas con labrafil (MPF-2) presentan eficacias medias de encapsulación más bajos y similar, con valores de $1,5 \pm 0,76\%$ y $1,90 \pm 0,80\%$, respectivamente.

Estudios in vitro

Citometría de flujo

La captación de las micropartículas por los macrófagos se ha determinado a partir de la complejidad granulométrica o complejidad celular interna de

los mismos utilizando la técnica de citometría de flujo. Los estudios fueron realizados a dos concentraciones de micropartículas; 0,5 y 0,8 mg/ml después de 3, 5 y 24 horas de incubación.

En las figuras 8.10 y 8.11 se muestran los resultados de granularidad de las diferentes formulaciones ensayadas a 0,5 y 0,8 mg/ml, respectivamente.

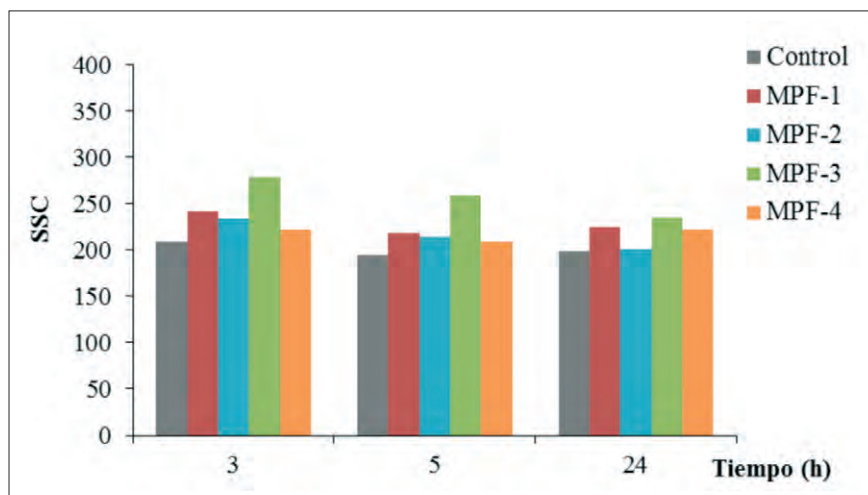


Figura 8.10. Complejidad granulométrica de las micropartículas de fluoresceína (0,5 mg/ml) tras 3, 5 y 24 horas de incubación.

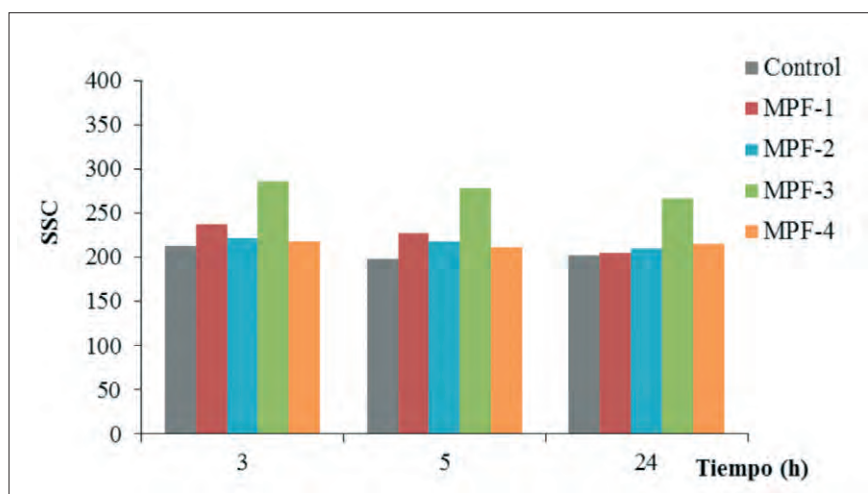


Figura 8.11. Complejidad granulométrica de las micropartículas de fluoresceína (0,8 mg/ml) tras 3, 5 y 24 horas de incubación.

Las células de macrófagos incubadas con la formulación MPF-3, a las dos concentraciones ensayadas, muestran los niveles más alto de granularidad. Está formulación corresponde a micropartículas preparadas con el polímero 502H. Algunos autores han indicado que el aumento de la granularidad es directamente proporcional al número de partículas fagocitadas (*Simón-Yarza y col., 2012*). Además, el reconocimiento previo de la micropartículas por parte de los macrófagos induce cambios en el citoesqueleto lo que probablemente podría modificar la complejidad granulométrica (*Patel y col., 2015*). Por otra parte, diversos autores han indicado que existe una relación entre la fagocitosis y el tiempo de incubación. Sin embargo, en nuestro caso, no se observa una modificación en la complejidad granulométrica debida a un mayor tiempo de exposición.

En las figuras 8.12 y 8.13 se muestran los resultados de intensidad de fluorescencia de las diferentes formulaciones ensayadas (MPF-1 a MPF-4) a las dos concentraciones estudiadas 0,5 y 0,8 mg/ml.

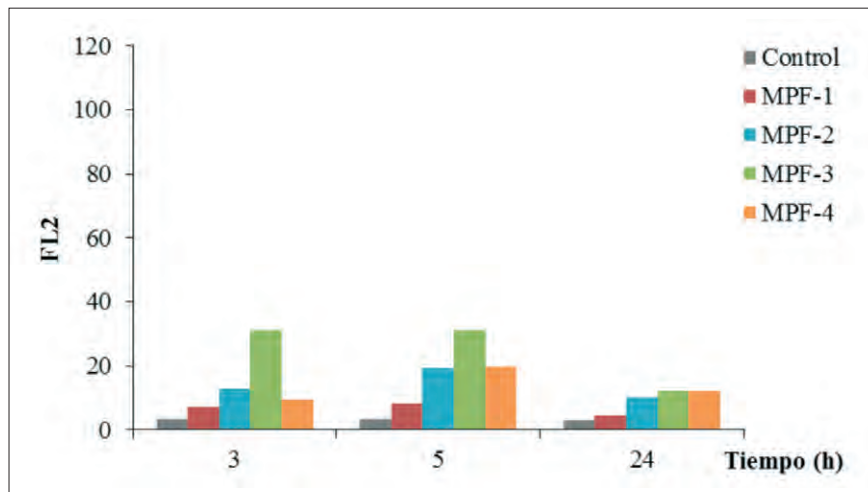


Figura 8.12. Intensidad de fluorescencia de las micropartículas de fluoresceína (0,5 mg/ml) tras 3, 5 y 24 horas de incubación.

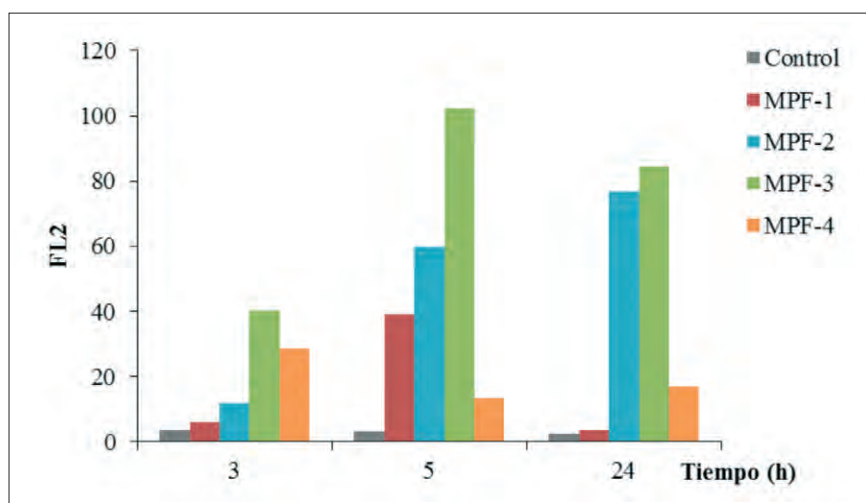


Figura 8.13. Intensidad de fluorescencia de las micropartículas de fluoresceína (0,8 mg/ml) tras 3, 5 y 24 horas de incubación.

Se puede observar que las micropartículas elaboradas con el polímero PLGA 502H (MPF-3) son las que presentan una mayor intensidad fluorescencia. Cuando se emplea el polímero PLGA 502, se obtiene valores de intensidad de fluorescencia superiores en la formulación modificada con labrafil respecto a la no modificada.

Es ampliamente conocido que las partículas con superficie más lipófila se fagocitan más fácilmente que las que presentan una superficie hidrófila. Diferentes autores han indicado que las microesferas con superficie hidrófila son más resistentes a la fagocitosis al quedar adheridas a la superficie de las células (*Mathaes y col., 2014*). Por tanto, el incremento en la fluorescencia obtenido con la formulación MPF-3, elaborada con el polímero más hidrófilo (RG 502H), podría ser debida a la unión de las micropartículas a la superficie de los macrófagos.

Microscopía confocal

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, se realizó un estudio de fagocitosis de las micropartículas mediante microscopia confocal.

Previamente, para estudiar el efecto del labrafil sobre los macrófagos, se incubaron las células con dos concentraciones de labrafil (35 y 70 μ l). En la figura 8.14 se muestran las microfotografías de los macrófagos tras 3 horas de incubación con las dos concentraciones de labrafil.

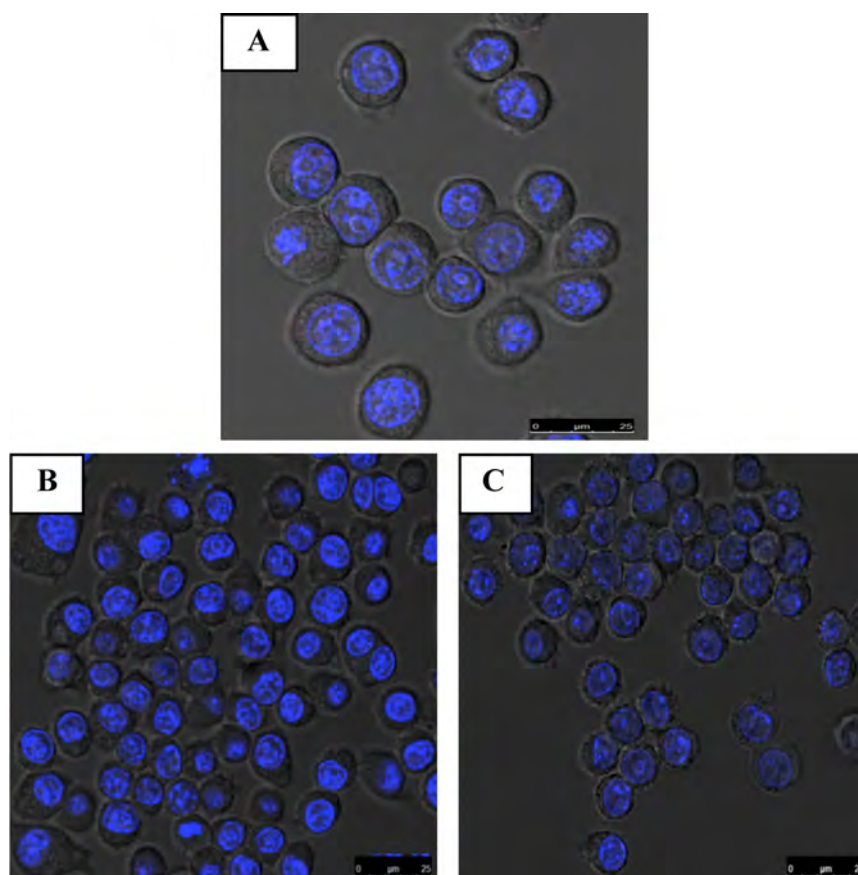


Figura 8.14. Microfotografías correspondientes a: control (A), 35 μ l de labrafil (B) y 70 μ l de labrafil (C) después de 3h de incubación.

Los resultados obtenidos no mostraron ninguna alteración ni en la viabilidad celular, ni en el aspecto de los macrófagos.

En las figuras 8.15 y 8.16 se muestran las fotografías obtenidas por microscopía confocal de las formulaciones cargadas con fluoresceína (MPF-1 a MPF-4) después de 3 y 5 horas de incubación, respectivamente.

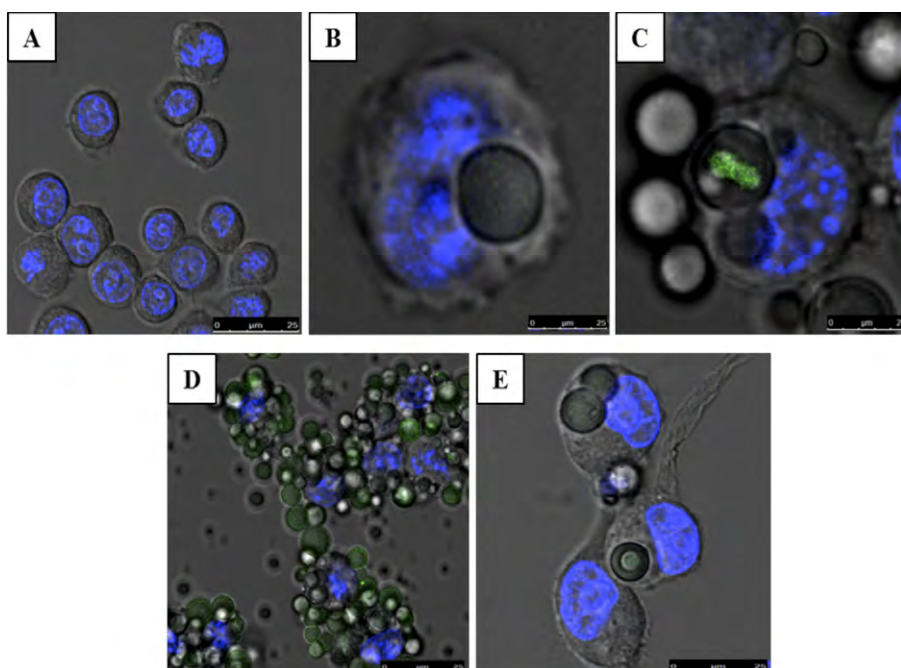


Figura 8.15. Microfotografías correspondientes a las MPs cargadas con FITC: control (A), MPF-1 (B), MPF-2 (C), MPF-3 (D) y MPF-4 (E) después de 3 h de incubación.

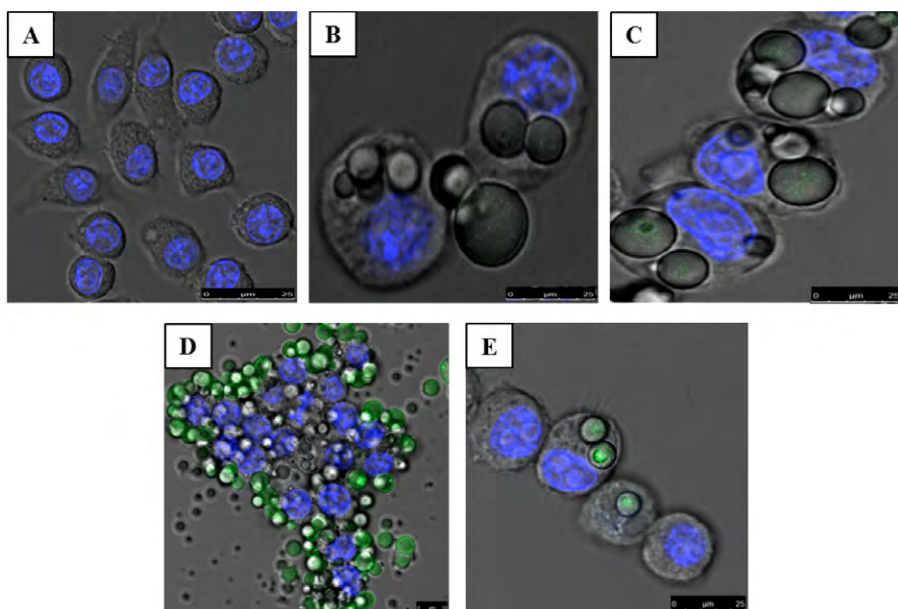


Figura 8.16. Microfotografías correspondientes a las MPs cargadas con FITC: control (A), MPF-1 (B), MPF-2 (C), MPF-3 (D) y MPF-4 (E) después de 5 h de incubación.

Como se ha comentado anteriormente, el colorante Hoeschst es un agente fluorescente que se excita a 350 nm de luz ultravioleta produciendo una fluorescencia azul cuando se encuentra unido al ADN. Esta tinción nos permite diferenciar los núcleos de los macrófagos.

La fluoresceína (FITC) es el compuesto responsable de la fluorescencia de las micropartículas, que podemos distinguir a partir de la fluorescencia de color verde presente en las diferentes microfotografías. Debido al tiempo de exposición y a la rápida cesión de la fluoresceína, esta fluorescencia no se advirtió en todas las microfotografías realizadas, aunque es posible observar la presencia de las micropartículas en el interior de los macrófagos.

A pesar de que todas las micropartículas elaboradas poseen un tamaño adecuado para su fagocitosis, entre 3-6 μm , se han observado diferencias en el proceso de fagocitosis, probablemente debidas a las características superficiales de las mismas. Las dos formulaciones modificadas con labrafil, MPF-2 y MPF-4, han sido fagocitadas a los dos tiempos de estudio 3 y 5 horas [Figuras 8.15 (C y E) y Figura 8.16 (C y E)]. Por el contrario, las micropartículas elaboradas con el polímero 502H sin modificar con labrafil (MPF-3) no fueron fagocitadas, ni a las 3 ni a las 5 horas de incubación [Figuras 8.15 (D) y 8.16 (D)]. La formulación MPF-3 posee una superficie más hidrófila en comparación con las micropartículas modificadas con labrafil. Dichas micropartículas, a tiempos cortos, se encuentran adheridas a la superficie de los macrófagos probablemente debido a la mayor hidrofilia que presentan en su superficie. Por lo que se confirma que valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para esta formulación (Figura 8.13) se deben, en gran medida, a su adhesión a la superficie de los macrófagos, lo que dificulta su fagocitosis. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por otros autores, que indican que las micropartículas con superficie hidrófila, no son fagocitadas, quedando adheridas a la superficie de las células cuando se realiza un estudio de fagocitosis *in vitro* (Mathaes y col., 2014).

De los resultados obtenidos podemos indicar que todas las formulaciones elaboradas son fagocitadas rápidamente por macrófagos excepto la

formulación MPF-3 que se queda adherida a la superficie al estar elaborada con un polímero más hidrófilo (RG 502H). La modificación del polímero con labrafil cambia la superficie de la micropartículas dando lugar a una rápida fagocitosis por los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 [Figuras 8.15 (E) y 8.16 (E)].

Dado que la formulación elaborada con el polímero 502H y modificada con labrafil (MPF-4) presentó la mayor eficacia de encapsulación de gatifloxacino junto con una rápida fagocitosis, esta formulación se considera la más adecuada para lograr los objetivos planteados.

Posteriormente, se evaluó la viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 tras 48h de incubación con la formulación seleccionada (MPF-4). En la figura 8.17 se muestra la fagocitosis de las microesferas MPF-4 así como la supervivencia de los macrófagos a tiempos largos.

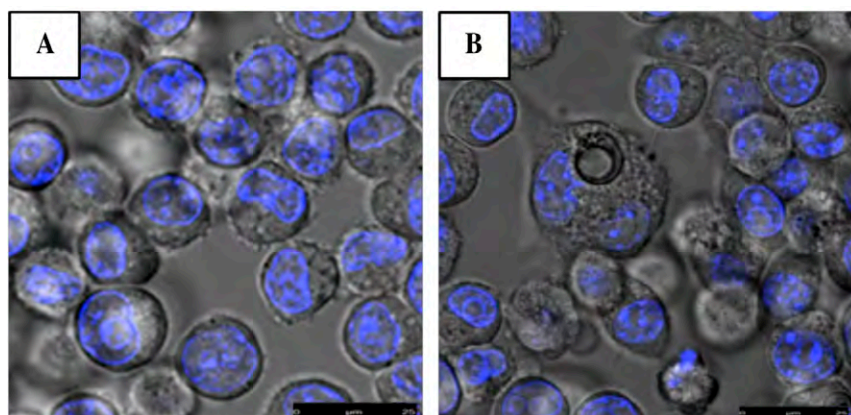


Figura 8.17. Microfotografías correspondiente a la formulación MPF-4: control (A) y formulación MPF-4 (B) después de 48 horas de incubación.

Debido a la rápida liberación del agente fluorescente (FITC), a las 48 h de incubación no se pudo observar la correspondiente fluorescencia de las micropartículas, sin embargo se puede comprobar tanto la fagocitosis de las micropartículas como la supervivencia de los macrófagos (Figura 8.17).

Como ya se ha comentado anteriormente, el tamaño de las micropartículas resulta crítico para la fagocitosis, por este motivo se comprobó, con el microscopio confocal, el tamaño de partícula de las micropartículas fagocitadas de la formulación MPF-4 (Figura 8.18).

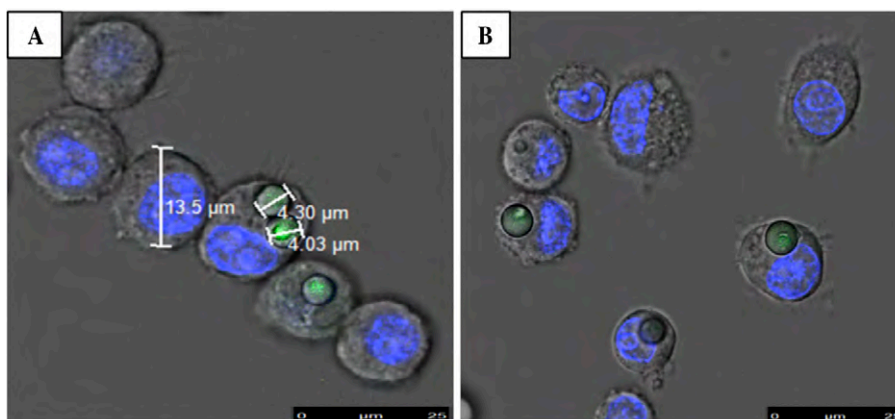


Figura 8.18. Microfotografías correspondiente a la formulación MPF-4. Tamaños de los macrófagos y de las MPs fagocitadas.

El tamaño de los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 determinado se encuentra entre 13 y 15 μm . Los resultados obtenidos nos muestran que las micropartículas modificadas con labrafil cuyos tamaños se encuentran entre 3 y 6 μm son fácil y rápidamente fagocitados por estos macrófagos.

Por otra parte, diferentes autores han puesto de manifiesto que existen diferentes mecanismos por los cuales se lleva a cabo el proceso de captación de las partículas por parte de los macrófagos (Allen y col., 1996). Dicho mecanismo está condicionado, en gran medida, por el tamaño de las partículas. Así, las partículas con tamaños comprendidos entre 0,5-10 μm son internalizadas mediante fagocitosis, mientras que aquellas de tamaños inferiores (80 y 120 nm) pueden ser internalizadas mediante pinocitosis como procesos dependientes de clatrina o caveolina (Hirota y Terada 2012). Por este motivo, se ha estudiado el mecanismo de fagocitosis de los macrófagos con la formulación seleccionada.

En la figura 8.19 se muestran las etapas del proceso de fagocitosis de la formulación MPF-4.

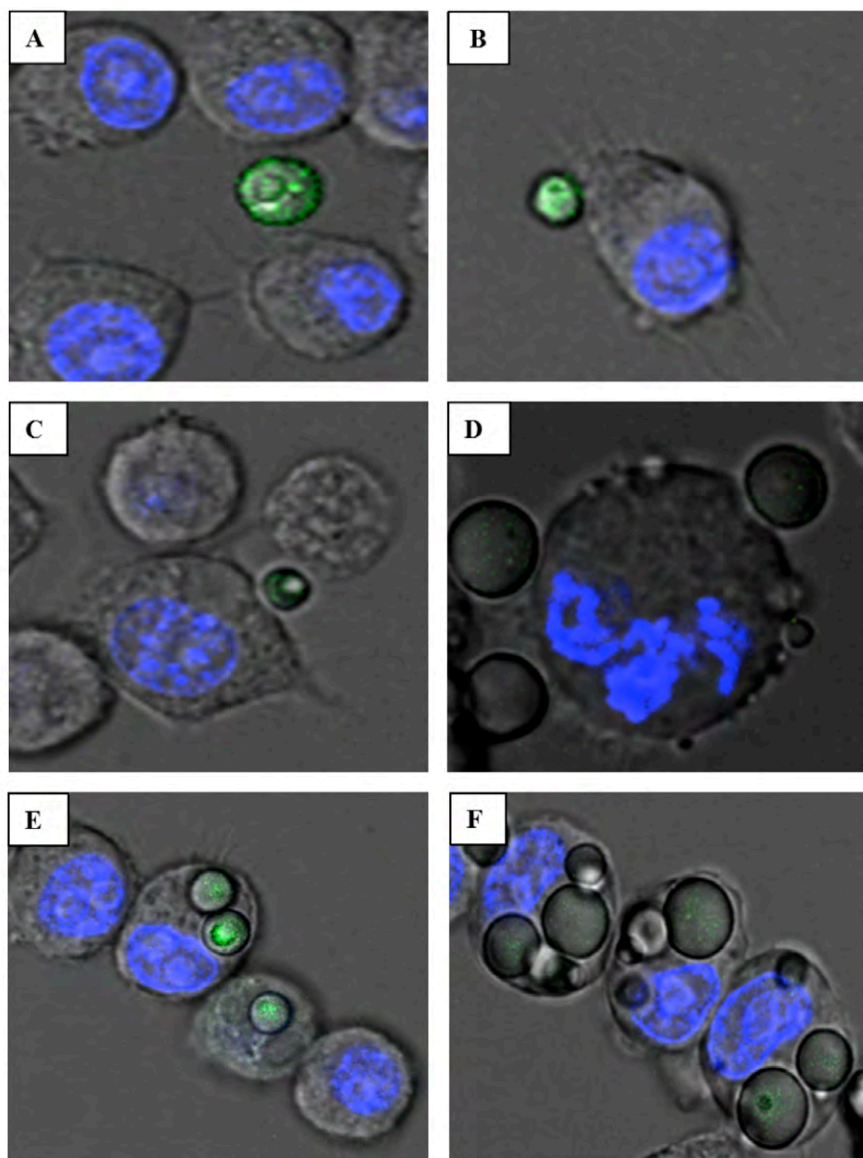


Figura 8.19. Microfotografías correspondiente al mecanismo de fagocitosis de la formulación MPF-4 después de su incubación con macrófagos de la línea celular RAW 264.7.

En la microfotografía A y B vemos la aproximación y unión de la microesferas a la superficie del macrófago, en las microfotografías C y D

observamos el proceso de internalización de las partículas a partir de la invaginación de la membrana del macrófago y, finalmente en las microfotografías E y F podemos observar la formación de la vacuola y su posterior fagocitosis. Estos procesos han sido descritos por distintos autores que han indicado que las partículas extrañas son recubiertas por proteínas solubles en un proceso conocido como opsonización. Posteriormente, estas partículas opsonizadas se unen a receptores localizados en la membrana de los macrófagos (*Greenberg y col., 2002*). Esta unión, induce cambios estructurales en el citoesqueleto con la consiguiente internalización de la partícula extraña. Se han propuesto dos mecanismos de internalización de las partículas extrañas, uno por endocitosis mediado por el complemento, donde la partícula es internalizada a través de la membrana celular por invaginación de la misma y otro, mediado por inmunoglobulinas donde la internalización de la partícula se produce a partir de pseudópodos en la superficie de los macrófagos (*Allen y col., 1996*). En nuestro caso, a la vista de las microfotografías obtenidas, probablemente la internalización de las micropartículas se produce por una invaginación en la membrana.

Por último, con el fin de comprobar que las micropartículas cargadas con GAT presentan un comportamiento similar al de las micropartículas de fluoresceína, se han incubado macrófagos con las formulaciones MP-10 y MP-15. Estas formulaciones corresponden a micropartículas preparados con el polímero PLGA 502H cargadas con GAT no modificadas (MP-10) y modificadas con labrafil (MP-15). Además, estos estudios nos permiten comprobar la viabilidad de los macrófagos después de su incubación con el agente antibacteriano (gatifloxacino).

En la figura 8.20 se muestran las fotografías obtenidas por microscopía confocal de las formulaciones ensayadas, MP-10 y MP-15, después de 24 y 48 de incubación, respectivamente.

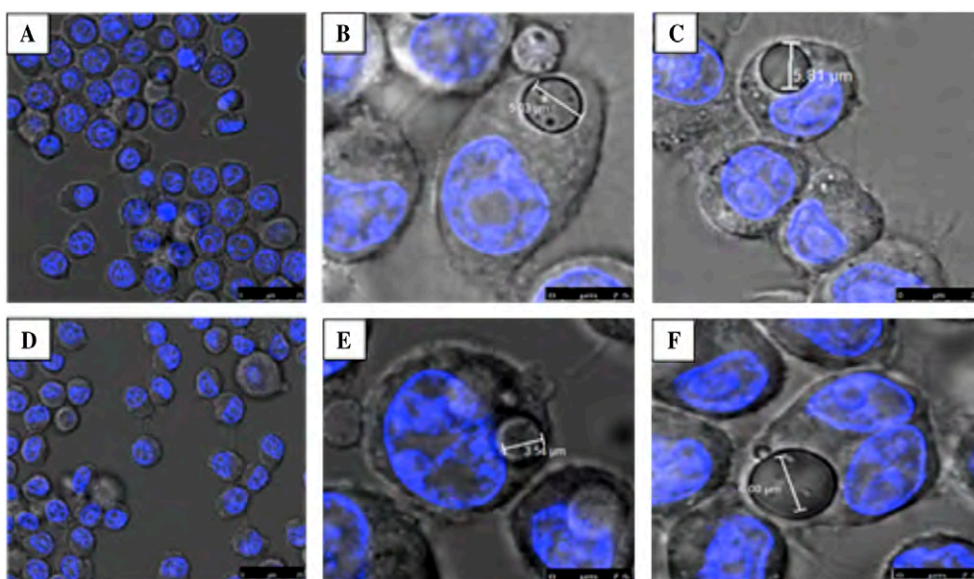


Figura 8.20. Microfotografías correspondiente a las MPs cargadas con GAT: control (A), MP-10 (B) y MP-15 (C) tras 24 h de incubación control (D), MP-10 (E), MP-15 (F) tras 48 h de incubación.

Las dos formulaciones preparadas con el polímero 502H cargadas con GAT han sido fagocitadas a los dos tiempos de estudio. Sin embargo, solo la formulación recubierta con labrafil es captada a tiempos cortos. Por otra parte, tras 48 horas los macrófagos continúan vivos con las microesferas en su interior liberando el GAT.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos indicar que la formulación de micropartículas de gatifloxacino elaborada con el polímero 502H y labrafil presenta una elevada eficacia de encapsulación y una rápida fagocitosis, por lo que es adecuada para lograr los objetivos planteados.

7. BIBLIOGRAFÍA

Akei H., Whitsett J. A., Buroker M., Ninomiya T., Tatsumi H., Weaver T. E., Ikegami M. Surface tension influences cell shape and phagocytosis in alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 291: 572-579, 2006.

Allen L. A., Aderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement and Fc receptor mediated phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.*, 184: 627-637, 1996.

Beningo K. A., Wang Y. L. Fc receptor mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J. Cell Sci.*, 115: 849-856, 2002.

Cailhier J. F., Sawatzky D. A., Kipari T., Houlberg K., Walbaum D., Watson S., Lang R. A., Clay S., Kluth D., Savill J., Hughes J. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 173: 540-547, 2006.

Carrasco L., Ruiz-Villamor E., Gomez-Villamandos J. C., Salguero F. J., Bautista M. J., Macia M., Quezada M., Jover A. Classical swine fever: morphological and morphometrical study of pulmonary intravascular macrophages. *J. Comp. Pathol.*, 125: 1-7, 2001.

Champion J. A., Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103: 4930-4934, 2006.

Chono S., Tanino T., Seki T., Morimoto K. Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes. *J. Drug Target*, 14: 557-566, 2006.

Coowanitwong I., Arya V., Kulvanich P., Hochhaus G. Slow release formulations of inhaled rifampin. *AAPS.*, 10:342-348, 2008.

Frankenberger M., Passlick B., Hofer T., Siebeck M., Maier K. L., Ziegler Heitbrock L. H. Immunologic characterization of normal human pleural macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 23:419-426, 2000.

Gaumet M., Vargas A., Gurny R., Delie F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 69: 1-9, 2008.

Geng Y., Dalhaimer P., Cai S., Tsai R., Tewari M., Minko T., Discher D. E. Shapeeffects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat. Nanotech.*, 2: 249-255, 2007.

Greenberg S., Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 136-145, 2002.

Gupta V., Gupta N., Shaik I. H., Mehvar R., McMurtry I. F., Oka M., Nozik-Grayck E., Komatsu M., Ahsan F. Liposomal fasudil, a rho-kinase inhibitor, for prolonged pulmonary preferential vasodilation in pulmonary arterial hypertension. *J. Control. Release*, 167: 189-199, 2013.

Gupta N., Ibrahim H. M., Ahsan F. Peptide-micelle hybrids containing fasudil for targeted delivery to the pulmonary arteries and arterioles to treat pulmonary arterial hypertension. *J. Pharm. Sci.*, 103: 3743-3753, 2014.

Hirota K., Hasegawa T., Hinata H., Ito F., Inagawa H., Kochi C., Soma, K., Makino G., Terada H. Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded PLGA microspheres by alveolar macrophages. *J. Control. Release*, 119: 69-76, 2007.

Hirota K., Hasegawa T., Nakajima T., Makino K., Terada H. Phagostimulatory effect of uptake of PLGA microspheres loaded with rifampicin on alveolar macrophages. *Colloid Surf. B. Biointerfaces*, 87: 293-298, 2011.

Hirota K., Terada H. Endocytosis of Particle Formulations by Macrophages and Its Application to Clinical Treatment. INTECH, Open Access Publisher, 16: 413- 428, 2012.

Landsman L., Jung S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. J. Immunol., 179: 3488-3494; 2007.

Laskin D. L, Weinberger B., Laskin J. D.Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. J. Leukoc. Biol., 70: 163-170, 2001.

Mathaes R., Winter G., Besheer A., Engert J. Influence of particle geometry and PEGylation on phagocytosis of particulate carriers Int. J. Pharm., 1-6, 2014.

Merle C. S., Fielding K., Sow O. B., Gninafon M., Lo M. B., Mthiyane T., Odhiambo J., Amukoye E., Bah B., Kassa F., N'Diaye A., Rustomjee R., Jong B. C., Horton J., Perronne C., Sismanidis C., Lapujade O., Olliaro P. L., Lienhardt C. A four-month gatifloxacin containing regimen for treating tuberculosis. N. Engl. J. Med., 17: 1588-1598, 2014.

Misharin A. V., Budinger G. R. S, Perlman H. The lung macrophage: a jack of all trades, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 84: 497-498, 2011.

Muttil P., Kaur J., Kumar K., Yadav A. B., Sharma R., Misra A. Inhalable microparticles containing large payload of anti-tuberculosis drugs. Eur. J. Pharm., 32: 140-150, 2007.

Nahar K., Absar S., Patel B., Ahsan F. Starch-coated magnetic liposomes as an inhalable carrier for accumulation of fasudil in the pulmonary vasculature. Int. J. Pharm., 464: 185-195, 2014.

O'Hara P., Hickey A. J. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization. Pharm. Res. 17: 955-961, 2000.

Patel B., Gupta N., Ahsan F. Aerosolized montelukast polymeric particles an alternative to oral montelukast alleviate symptoms of asthma in a rodent model. *Pharm. Res.*, 31: 3095-3105, 2014.

Patel B., Gupta N., Ahsan F. Particle engineering to enhance of lessen particle uptake by alveolar macrophages and to influence the therapeutic outcome. *Eur. J. Pharm. And Biopharm.*, 89: 63-174, 2015.

Patton J. S., Byron P. R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6: 67-74, 2007.

Ruan Q., Liu Q., Sun F., Shao L., Jin J., Yu S., Ai J., Zhang B., Zhang W. Moxifloxacin and gatifloxacin for initial therapy of tuberculosis: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Emerg. Microbes Infect.*, 24: 1038-1050, 2016.

Rubins J. B. Alveolar macrophages wielding the double-edged sword of inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 167:103-104, 2003.

Ruge C. A., Schaefer U. F., Herrmann J., Kirch J., Canadas O., Echaide M., Perez-Gil J., Casals C., Muller R., Lehr C. M. The interplay of lung surfactant proteins and lipids assimilates the macrophage clearance of nanoparticles. *Plos One*, 7: 1-7, 2012.

Schleh C., Rothen-Rutishauser B., Kreyling W. G. The influence of pulmonary surfactant on nanoparticulate drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 77: 350-352, 2011.

Schneberger D., Aharonson-Raz K., Singh B. Pulmonary intravascular macrophages and lung health: what are we missing?, *Am J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302: 498-503, 2012.

Sethuraman V. V., Hicke A. J. Powder properties and their influence on dry powder inhaler delivery of an antitubercular drug. *AAPS.*, 3: 28, 2002.

Sharma R., Muttill P., Yadav A. B., Rath S. K., Bajpai V. K., Mani U., Misra A. Uptake of inhalable microparticles affects defence responses of macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis H37Ra. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59:499-506, 2007.

Simón-Yarza T., Formga F. R., Esther Tamayo E., Pelacho B., Prosper F., J. Blanco-Prieto M. J. PEGylated-PLGA microparticles containing VEGF for long term drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 440: 13-18, 2012.

Suarez S., O'Hara P., Kazantseva M., Newcomer C. E., Hopfer R., McMurray D. N., Hickey A. J. Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: screening in an infectious disease model. *Pharm. Res.*, 18: 1315-1319, 2001.

Tomoda K., Makino K. Effects of lung surfactants on rifampicin release rate from monodisperse rifampicin-loaded PLGA microspheres. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 55: 115-124, 2007.

Yoo J. W., Mitragotri S. Polymer particles that switch shape in response to a stimulus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107: 11205-11210, 2010.

IX. CONCLUSIONES

1. El método de cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución puesto a punto y validado para la cuantificación de gatifloxacino resultó ser lineal (rango de concentraciones de 4 µg/ml a 40 µg/ml), exacto y selectivo, por lo que resulta adecuado para cuantificar el contenido del activo en las nanopartículas y micropartículas desarrolladas.
2. Se ha puesto a punto y validado un método de cuantificación por espectrofotometría UV para la cuantificación de gatifloxacino. El método resultó ser lineal, en el rango de concentraciones de 1-15 µg/ml, exacto y selectivo, siendo adecuado para la cuantificación del principio activo liberado en los ensayos *in vitro* a partir de las nanopartículas y micropartículas desarrolladas.
3. El método de elaboración por nanoprecipitación desarrollado, resultó apropiado para la obtención de nanopartículas de PLGA cargadas con gatifloxacino. Las nanopartículas obtenidas presentaron tamaños medios inferiores a 250 nm, con distribuciones monodispersas, siendo adecuadas para conseguir su paso a través de la barrera hematoencefálica.
4. Todas las formulaciones de nanopartículas de rodamina administradas por vía intravenosa son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. A los 30 minutos, el paso a hipocampo de las nanopartículas funcionalizadas con labrafil y con polisorbato 80, es superior al obtenido con las nanopartículas sin funcionalizar.
5. La modificación superficial de las nanopartículas de rodamina empleando polisorbato 80 y labrafil, incrementa su paso a corteza cerebral a los 60 minutos de su administración. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron tres veces superiores a los obtenidos con las nanopartículas sin funcionalizar.
6. Los estudios de biodistribución en hígado y pulmón muestran, a los 30 y 60 minutos, mayores cantidades de nanopartículas en pulmón

que en hígado. La mayor distribución en pulmón resulta adecuada para el tratamiento de la tuberculosis, ya que, el *Mycobacterium tuberculosis* se localiza mayoritariamente en este órgano.

7. De los tres tipos de nanopartículas de gatifloxacino desarrolladas, las modificadas con polisorbato 80 son las que presentan una mayor carga de activo y consiguen incrementar su paso a través de barrera hematoencefálica, por lo que resultan las más adecuadas para el tratamiento de la tuberculosis cerebral.
8. El método de microencapsulación desarrollado, utilizando 200 mg de PLGA, 20 ml de PVA al 0,5% y 8.500 rpm, permite obtener microesferas con tamaños medios de partícula entre 3 y 5 μm , adecuados para su administración pulmonar.
9. El empleo del polímero PLGA 502H para la elaboración de microesferas, consigue aumentar la cantidad de gatifloxacino encapsulada, incrementándose significativamente dicha cantidad cuando se incorpora labrafil a la formulación.
10. Las micropartículas elaboradas con el polímero PLGA 502H, después de 5 horas de incubación, quedan adheridas a la superficie de los macrófagos, siendo fagocitadas a las 24 horas.
11. La incorporación de labrafil a las micropartículas elaboradas con el polímero PLGA 502H consigue reducir el tiempo de fagocitosis de 24 a 3 horas.
12. Las microesferas de gatifloxacino elaboradas con el polímero PLGA 502H y modificadas con labrafil son las que presentan una mayor carga del activo, un tamaño de partícula adecuado para la administración por vía pulmonar y son capaces de permanecer en el interior de los macrófagos al menos durante 48 horas.

X. SUMMARY

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a highly contagious infection caused by *M. tuberculosis*. TB appears mainly in the lungs but can also develop as extrapulmonary tuberculosis in the central nervous system (CNS). The control of resistant TB represents an important challenge; the downside of currently treatment is mainly due to patient noncompliance which is attributed to the long treatment, high rate of adverse effect due to non-specific distribution. Despite global TB eradication efforts, it is still a global public health concern.

OBJETIVE

The main objective of this doctoral thesis is the development of two controlled delivery system of gatifloxacin (GAT) to enhance the currently treatment of TB disease targeting the drug directly in the site of action. Biodegradable nanoparticles (NPs) have been developed to cross BBB in order to treat cerebral tuberculosis. The other therapeutic system consists of biodegradable microspheres (MPs); it has been developed in order to uptake by alveolar macrophages for pulmonary TB. This formulation could achieve high intracellular drug concentration in macrophages and would reduce side effects associated with long-term systemic/oral antitubercular therapy. Thereby, it could reduce the duration of treatment and prevent the multi-drug resistance.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

- Development and validation of two analytical methods for the quantification of GAT: UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC).
- Development and characterization of biodegradable NPs.
- Evaluation of the *in vivo* transport of NPs through the BBB of rats.

- Evaluation of the NPs biodistribution in liver and lung.
- Development and characterization of biodegradable MPs.
- Evaluation of the *in vitro* uptake by RAW 264.7 macrophages cell line of MPs.

RESULTS AND DISCUSSION

Development and validation of two analytical methods for the quantification of GAT: UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC)

Both methods have allowed the quantification of GAT encapsulated in micro- and nanoparticles, and the samples from *in vitro* released studies.

Development and characterization of biodegradables NPs of GAT

NPs were elaborated using PLGA (poly D, L-lactic-co-glycolic acid) Resomer (RG 502) and prepared by nanoprecipitation technique. The functionalized NPs were elaborated incorporating two surfactants, polysorbate 80 or labrafil 1944 CM. PLGA-polysorbate 80 NPs were prepared adding the surfactant into aqueous phase with polyvinyl alcohol. On the other hand, PLGA-labrafil NPs were prepared by the same method but incorporating the labrafil into the organic phase.

GAT-loaded PLGA NPs exhibited mean particle sizes of 200 nm, which are suitable for crossing the BBB. Mean encapsulation efficiency (EE) obtained for GAT- loaded PLGA-polysorbate 80 NPs was $28.24 \pm 0.23\%$ higher than other formulations.

Evaluation of the *in vivo* transport of NPs through the BBB of rats

Rh loaded PLGA NPs, Rh loaded PLGA polysorbate 80 NPs and Rh loaded PLGA labrafil NPs were developed to perform the *in vivo* study. This compound is a fluorescent dye that is used to determine the biodistribution of NPs for qualitative and quantitative analysis. The *in vivo* study, was carry out using Male Wistar rats (Harlan, France) weighing 250-300 g. Animals were anesthetized and injected with the corresponding formulation (50 mg/kg) in the tail vein. At 30 min or 60 min after administration, animals were sacrificed and brains were removed. Thereafter, brain slices were analyzed by confocal scanning microscopy.

At 30 min and at 60 min the highest intensity of fluorescence was obtained in hippocampus cortex and cerebral cortex, respectly for functionalized NPs. Furthermore, at 60 min the intensity of fluorescence for functionalized NPs was 3-fold higher than unmodified NPs.

Several studies have shown that the presence of polysorbate 80 on the surface of nanocarriers improve their passage through the BBB, which can be explained by the adsorption of plasmatic apolipoprotein, on the NPs surface. Apolipoprotein is recognized by receptors of the surface of endothelial cells of the BBB as a low-density lipoprotein (LDL), being transported through the barrier after i.v. administration.

Evaluation of the NPs biodistribution in liver and lung

The biodistribution of fluorescence NPs in liver and lung, were expressed as Rh amount per gram tissue. In all formulations lung concentrations were higher than liver. This fact is suitable for the treatment of TB disease because *M. tuberculosis* affects mainly in the lung.

The results obtained from cerebral cortex and biodistribution studies show that the functionalized NPs with two surfactants, polysorbate 80 /labrafil, increase significantly the through across the BBB into CNS. Taking account

the high EE of Rh loaded PLGA -polysorbate 80 NPs, this formulation is the most suitable for our aims.

Development and characterization of biodegradable MPs of GAT

MPs were prepared by extraction-evaporation technique from O/W emulsion using PLGA RG 502 and RG 502H. Moreover, it has been elaborated MPs with labrafil as surface modifier. The method was optimized to achieve particle sizes between 3-5 μm and monodisperse distributions. These particle sizes are suitable to be uptaken by alveolar macrophages.

Mean EE of MPs elaborated with PLGA 502 with and without labrafil ($34.23 \pm 1.56\%$; $7.25 \pm 0.09\%$, respectively) were lower than the MPs elaborated with the polymer PLGA 502H. The GAT loaded PLGA labrafil MPs showed higher EE ($89.59 \pm 0.19\%$) with mean particle size of $4.53 \pm 0.81 \mu\text{m}$.

Evaluation of the *in vitro* uptake by RAW 264.7 macrophages cell line of MPs

FITC loaded PLGA 502 MPs and FITC loaded PLGA 502H MPs with and without labrafil, were prepared to carry out *in vitro* study in RAW 264.7 macrophages cell line. The mechanisms of phagocytosis were studied by flow cytometry and fluorescence microscopy. The MPs uptake study was analyzed at different times (3, 5, 24 and 48 h). The PLGA 502-MPs were phagocytized at 3h, whereas the PLGA 502H-MPs were not phagocytized at short times this fact could be that MPs remain attached into the macrophages surface. However, PLGA 502H MPs with labrafil were phagocytized at 3 h. GAT loaded PLGA 502H MPs keep inside the macrophages at least 48 h releasing the drug. The GAT loaded PLGA 502H labrafil MPs were faster phagocytized.

CONCLUSIONS

Two analytical methods for the quantification of GAT encapsulated in micro- and nanoparticles have been developed and validated.

At 60 min the functionalized NPs show low concentrations in lungs and liver, however the fluorescence increase in the brain section at the same time, due probably to the passage of the modified NPs to the CNS.

GAT loaded PLGA polysorbate 80 NPs show high EE and achieve increase their through across the BBB. These facts make this formulation the most suitable for the treatment of cerebral TB.

The microencapsulation technique allows obtaining particle sizes between 3-5 μ m and monodisperse distributions adequate to pulmonar administration.

MPs elaborated with the polymer PLGA 502H increase the EE, moreover this rate increase significantly when labrafil is incorporated.

The labrafil incorporation as modifier surface in 502H PLGA MPs allow to decrease phagocytosis time from 24 to 3 h.

GAT loaded PLGA 502H labrafil MPs show higher EE and suitable mean particle size to be administered by pulmonar administration and faster phagocytosis.

XI. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. La bacteria se localiza principalmente en pulmón, TB pulmonar, aunque también puede afectar a otras zonas desarrollándose la TB cerebral. El alto porcentaje de efectos adversos de los tratamientos actuales y la extensa duración de los mismos, han llevado a una baja adherencia al tratamiento por parte de los pacientes desarrollándose resistencias y dando lugar al fracaso terapéutico. Por ello, esta patología constituye un auténtico problema de salud pública.

OBJETIVO

El objetivo general de la tesis doctoral es mejorar los tratamientos de la TB mediante la vectorización de GAT al lugar de acción. Para ello, se han desarrollado dos sistemas multiparticulares biodegradables. Uno de ellos corresponde a nanopartículas de PLGA cargadas con gatifloxacino, capaz de atravesar la BHE, útiles para el tratamiento de la TB cerebral. El otro sistema, consiste en una formulación de microesferas biodegradables de PLGA con GAT para ser administradas por vía pulmonar, capaz de acceder a los macrófagos alveolares, actuando directamente en el reservorio del *Mycobacterium tuberculosis*. Con esta formulación se pretende reducir las resistencias y efectos adversos, acortar la duración del tiempo de tratamiento y disminuir las dosis.

PARTE EXPERIMENTAL

- Desarrollo y validación de dos métodos para la cuantificación de gatifloxacino: cromatografía líquida de alta eficacia y espectrofotometría UV.
- Desarrollo y caracterización de nanopartículas biodegradables de gatifloxacino.

- Evaluación *in vivo* del paso de las nanopartículas a través de la BHE.
- Evaluación de la biodistribución de las nanopartículas en hígado y pulmón.
- Desarrollo y caracterización de microesferas biodegradables de gatifloxacino.
- Evaluación *in vitro* del proceso de fagocitosis de las micropartículas empleando la línea celular RAW 264.7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ambas métodos resultaron ser lineales, exactos y selectivos, permitiendo la cuantificación de GAT encapsulado en los sistemas, así como en las muestras procedentes de los estudios de cesión *in vitro*.

Desarrollo y caracterización de nanopartículas biodegradables de gatifloxacino

El método empleado en la preparación de las nanopartículas (NPs) ha sido el de nanoprecipitación, utilizando dos agentes tensioactivos para su funcionalización; polisorbato 80 y labrafil. Ambos compuestos se incorporan en el momento de elaboración. Todas las NPs cargadas con GAT obtenidas presentaron tamaños próximos a los 200 nm y, por tanto, son adecuados para favorecer el paso a través de la BHE. La formulación que presentó una mayor EE corresponde a las NPs funcionalizadas con polisorbato ($28,24 \pm 0,23\%$).

Evaluación *in vivo* del paso de las nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica

Se han preparado tres diferentes formulaciones de nanopartículas: nanopartículas de PLGA sin funcionalizar, nanopartículas de PLGA funcionaliza-

das con polisorbato 80 o labrafil, incluyendo la rodamina 123 como agente fluorescente. El estudio se realiza empleando ratas Wistar macho a las que se le administra una suspensión de nanopartículas (50 mg/Kg) en la vena de la cola. A los 30 y 60 min los animales fueron sacrificados. Tras la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en los cortes cerebrales de hipocampo, se observa que a los 30 min y 60 min, los valores más altos se obtienen después de la administración de las NPs modificadas. Así, la intensidad de fluorescencia obtenida en hipocampo y corteza para la formulación de nanopartículas no funcionalizadas es aproximadamente 3 veces inferior a la obtenida para las dos formulaciones funcionalizadas.

La mayoría de los autores sostienen que el paso a través de la BHE de las NPs recubiertas con polisorbato 80 se debe a que, tras la administración por vía parenteral, las apolipoproteínas A y E del plasma se adhieren a la superficie del sistema quedando adsorbida en las nanopartículas. Al llegar a la BHE son reconocidas por los receptores expresados permitiendo el paso de las NPs al cerebro.

Evaluación de la biodistribución de las nanopartículas no funcionalizadas y funcionalizadas en hígado y pulmón

Los estudios de biodistribución en hígado y pulmón mostraron que las cantidades de nanopartículas, a los dos tiempo de estudio 30 y 60 minutos, son mayores en pulmón que en hígado. Esta mayor distribución en pulmón, resulta adecuada para el tratamiento de la tuberculosis ya que el *Mycobacterium tuberculosis* se encuentra mayoritariamente en este órgano.

Los resultados obtenidos a partir de los cortes cerebrales y los estudios de biodistribución indican que, la modificación superficial de las nanopartículas de PLGA con polisorbato 80 y labrafil incrementa, de forma significativa, su paso a través de la BHE al cerebro. Si tenemos en cuenta la mayor carga de las nanopartículas modificadas con polisorbato 80, consideramos esta formulación la más adecuada para nuestros objetivos.

Desarrollo y caracterización de microesferas biodegradables de gatifloxacino

El método empleado para la elaboración de micropartículas de GAT ha sido el de evaporación y extracción del solvente a partir de una emulsión O/A. Se emplean los polímeros PLGA 502 y PLGA 502H con y sin labrafil. El método se optimizó para conseguir tamaños de partícula entre 3 y 5 μm y una distribución monodispersa. Este tamaño es necesario para que las micropartículas alcancen los alveolos cuando son administradas por vía pulmonar. Además, las partículas con tamaños entre 2 y 6 μm son más fácilmente fagocitadas por macrófagos. La eficacia de encapsulación de las micropartículas elaboradas con el polímero 502 con o sin labrafil es muy baja ($34,23 \pm 1,56\%$; $7,25 \pm 0,09\%$, respectivamente). Las micropartículas elaboradas con el polímero 502H consiguen un incremento en la EE del GAT. La formulación elaborada el polímero PLGA 502H y modificada con labrafil es la que presenta una mayor EE del activo ($89,59 \pm 0,19\%$) y un tamaño medio de $4,53 \pm 0,81 \mu\text{m}$.

Evaluación *in vitro* del proceso de fagocitosis de las micropartículas de fluoresceína empleando la línea celular RAW 264.7

Se prepararon microesferas biodegradables de fluoresceína con PLGA 502 y PLGA 502H con y sin la superficie modificada con labrafil. Para los estudios de fagocitosis se emplea la línea celular RAW 264.7 de macrófagos de ratón. Se observa el proceso de fagocitosis mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Los estudios se realizan tras la incubación de las micropartículas con los macrófagos a diferentes tiempos (3, 5, 24 y 48h). Las micropartículas elaboradas con el polímero 502 con y sin labrafil fueron fagocitadas con facilidad. Las micropartículas elaboradas con el polímero 502H, no son fagocitadas durante las primeras horas, quedando adheridas a la superficie de los macrófagos. Sin embargo, las micropartículas elaboradas con el polímero 502H y labrafil son rápidamente fagocitadas a las 3h. Las micropartículas elaboradas con el polímero 502H con gatifloxacino permanecen en el interior de los macrófagos durante al menos 48h liberando el activo.

CONCLUSIONES

Dos métodos analíticos para la cuantificación de gatifloxacino (espectrofotometría U.V. y HPLC) han sido desarrollados y validados. Ambos métodos son lineales exactos selectivos y sensibles.

Las nanopartículas modificadas presentan, a los 60 min, una reducción en su distribución en hígado y pulmón, junto con un incremento de la fluorescencia en cerebro lo que nos indica que la modificación de la superficie de las nanopartícula con polisorbato 80 y/o con labrafil incrementa el paso de nanopartículas al cerebro.

Las NPs modificadas con polisorbato 80 presentan una mayor carga de activo y consiguen incrementar su paso a través de BHE siendo las más adecuadas para el tratamiento de la TB cerebral.

El método de elaboración de las microesferas resulta adecuado para la obtención de microesferas con tamaños de partícula medios entre 3 y 5 μm y una distribución monodispersa, adecuado para la administración pulmonar.

El empleo del polímero PLGA 502H para la elaboración de microesferas, consigue aumentar la cantidad de GAT encapsulada, incrementándose significativamente cuando se incorpora labrafil a la formulación.

La incorporación de labrafil a las formulaciones elaboradas con el polímero 502H consigue reducir el tiempo de fagocitosis de 24 a 3h.

Las microesferas elaboradas con el polímero 502H modificadas con labrafil presentan una mayor carga del activo con un tamaño de partícula adecuado para la administración por vía pulmonar y rápida fagocitosis en macrófagos.

